

**CHARAKTERISIERUNG DER SCHILDDRÜSENFUNKTION
UND NACHWEIS EINES PROMOTORDEFEKTES
ALS URSACHE DES KOMPLETTEN THYROXIN-
BINDENDEN GLOBULIN-MANGELS BEIM HUND**

SUSANNE JANßEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie des Fachbereiches
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: Professor Dr. R. Gerstberger

und

**dem Zentrum für Innere Medizin, Klinik für Endokrinologie,
Universitätsklinikum Essen der Universität Duisburg-Essen**

Betreuer: Professor Dr. O.E. Janßen

**CHARAKTERISIERUNG DER SCHILDDRÜSENFUNKTION UND NACHWEIS
EINES PROMOTORDEFEKTES ALS URSACHE DES KOMPLETTEN
THYROXIN-BINDENDEN GLOBULIN-MANGELS BEIM HUND**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

SUSANNE JANßEN

Tierärztin aus Iserlohn

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. R. Gerstberger
Prof. Dr. O.E. Janßen

Tag der Disputation: 19.04.2007

in Erinnerung an meinen Vater,

Manfred Kniezner

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 EINFÜHRUNG.....	1
2 EINLEITUNG.....	2
2.1 DIE SCHILDDRÜSE DES HUNDES.....	2
2.1.1 Embryonale Entwicklung	2
2.1.2 Makroskopische Anatomie.....	3
2.1.3 Mikroskopische Anatomie.....	5
2.2 Physiologie	6
2.2.1 Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone.....	7
2.2.2 Regulation der Schilddrüsenfunktion	10
2.2.3 Wirkung der Schilddrüsenhormone	12
2.2.4 Abbau der Schilddrüsenhormone	16
2.2.5 Die Hypothese der freien Hormone (free-hormone-hypothesis)	17
2.2.6 Schilddrüsenhormontransport im Blut.....	18
2.2.6.1 Albumin	19
2.2.6.2 Transthyretin (TTR)	20
2.2.6.3 Thyroxin-bindendes Globulin (TBG).....	20
2.2.6.3.1 <i>Das humane TBG-Gen</i>	20
2.2.6.3.2 <i>Struktur des humanen TBG</i>	22
2.2.6.3.3 <i>Konzentration von TBG im menschlichen Serum</i>	23
2.2.6.3.4 <i>TBG bei anderen Spezies</i>	25
2.3 SCHILDDRÜSENFUNKTIONSTÖRUNGEN BEIM HUND.....	26
2.3.1 Canine Hypothyreose	26
2.3.1.1 Primäre canine Hypothyreose.....	28
2.3.1.2 Sekundäre canine Hypothyreose.....	28
2.3.1.3 Tertiäre Hypothyreose	29
2.3.2 Klinisches Bild der caninen Hypothyreose.....	30
2.3.3 Diagnose der caninen Hypothyreose.....	30
2.3.3.1 Bestimmung von Thyroxin	31
2.3.3.2 Bestimmung des caninen TSH	32
2.4 CANINE HYPERTHYREOSE	33
2.5 FRAGESTELLUNG.....	34

3	MATERIAL, GERÄTE UND METHODEN	34
3.1	MATERIALIEN	34
3.1.1	Chemikalien	34
3.1.2	Enzyme	36
3.1.3	<i>E. coli</i> -Laborstamm und Liste der verwendeten Plasmidvektoren	36
3.1.4	Überblick über Sequenzen und Spezifitäten sämtlicher in der Arbeit verwendeter Oligonukleotid-Primer	37
3.1.5	DNA Marker	37
3.1.6	Kits	38
3.1.7	Eukaryotische Zelllinie	38
3.1.8	Nährmedien	38
3.1.9	Lösungen	40
3.1.9.1	Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	40
3.1.9.2	Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
3.1.9.3	Lösungen für T ₄ -Bindungstest	41
3.1.9.4	Lösungen für die Ligation	41
3.1.9.5	Lösungen für die Restriktion von DNA	42
3.2	GERÄTE	42
3.3	METHODEN	43
3.3.1	Hormonbestimmungen	43
3.3.2	Molekularbiologische Methoden	43
3.3.2.1	Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut	43
3.3.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNA über die optische Dichte	43
3.3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion	44
3.3.2.4	Aufreinigung der PCR Produkte	45
3.3.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA auf Agarose-Gelen	45
3.3.2.6	Sequenzierung	46
3.3.2.7	T ₄ -Bindungstest	47
3.3.2.8	Klonierung des hTBG-Promotors von pCAT in pBluescript	48
3.3.2.8.1	<i>Restriktionsenzym-Verdau</i>	48
3.3.2.8.2	<i>Gelelektrische Auftrennung von pBluescript und insert</i>	49
3.3.2.8.3	<i>Fragmentelution aus Agarosegelen</i>	49
3.3.2.8.4	<i>Ligation</i>	50
3.3.2.8.5	<i>Transformation in den E. coli-Stamm DH5α</i>	51
3.3.2.8.6	<i>Mini-Präparation von Plasmid-DNA</i>	52
3.3.2.8.7	<i>Restriktion</i>	52
3.3.2.9	Klonierung von pBluescript in pGL4	53

3.3.2.9.1	<i>Restriktion</i>	53
3.3.2.9.2	<i>Gelelektrophoretische Auftrennung von pGL4 und insert</i>	53
3.3.2.9.3	<i>Fragmentelution aus Agarosegelen</i>	53
3.3.2.9.4	<i>Ligation</i>	53
3.3.2.9.5	<i>Transformation</i>	53
3.3.2.9.6	<i>Minipräparation von Plasmid-DNA</i>	53
3.3.2.9.7	<i>Restriktion</i>	54
3.3.2.9.8	<i>Verifizierung der Klone durch Sequenzierung</i>	54
3.3.2.10	<i>In vitro-Mutagenese</i>	54
3.3.2.10.1	<i>Mutagenese-Reaktion</i>	54
3.3.2.10.2	<i>Transformation</i>	56
3.3.2.10.3	<i>Minipräparation von Plasmid-DNA</i>	57
3.3.2.10.4	<i>Verifizierung der DNA-Konstrukte durch Sequenzierung</i>	57
3.3.2.11	<i>Luciferase-Assay (TBG-Promotor-Aktivität)</i>	57
3.3.2.11.1	<i>Zellkultur</i>	58
3.3.2.11.2	<i>Transfektion</i>	59
3.3.2.11.3	<i>Luciferase-Assay am Luminometer</i>	60
4	ERGEBNISSE	61
4.1	SCHILDDRÜSENHORMONPARAMETER BEIM HUND	61
4.2	VERGLEICH DER SCHILDDRÜSENPARAMETER BEI HUND UND MENSCH	62
4.3	TBG-ASSAY (SPEZIFISCHER T₄-BINDUNGSTEST)	66
4.4	SEQUENZIERUNG DES TBG-GENS	68
4.5	CHARAKTERISIERUNG DER EXPRESSION DES TBG-PROMOTORS VOM HUND IM VERGLEICH MIT DEM VOM MENSCHEN UND DEM DER MAUS	73
4.5.1	Klonierung der humanen TBG-Promotor-Sequenz aus pCAT über pBluescript in pGL4	73
4.5.2	Konstruktion von Hund- und Maus-spezifischen HNF-1 Bindungsstellen im TBG-Promotor	76
4.5.3	Expression der TBG-Promotor Konstrukte in HepG2-Zellen	77
5	DISKUSSION	80
6	ZUSAMMENFASSUNG	93
7	SUMMARY	94
8	LITERATURVERZEICHNIS	95
9	DANKSAGUNG	106

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Schematische Darstellung der Embryologie der Schilddrüse, der Epithelkörperchen und des Thymus	2
Abb. 2	Synthese der Schilddrüsenhormone in einem Schilddrüsenfollikel	9
Abb. 3	Chemische Strukturformeln der Schilddrüsenhormone	10
Abb. 4	Regelkreis der Schilddrüsenhormon-Freisetzung	11
Abb. 5	Struktur des Schilddrüsenhormonrezeptors TR-β1	13
Abb. 6	Expression der α- und β-Schilddrüsenhormonrezeptoren in verschiedenen Geweben.....	15
Abb. 7	Aktivierung der Genexpression durch Schilddrüsenhormone	16
Abb. 8	Abbau der Schilddrüsenhormone	17
Abb. 9	Organisation des humanen TBG-Gens	21
Abb. 10	Verschiedene Glykosilierungsformen des TBG	23
Abb. 11	In-vitro-Mutagenese	56
Abb. 12	Vergleich der Schilddrüsenfunktionsparameter verschiedener Hunderassen relativ zum Gesamtkollektiv.....	62
Abb. 13	Vergleich der Relation von FT ₄ :TT ₄ bei Mensch und Hund.....	63
Abb. 14	Relation der FT ₄ -Werte zum TSH bei Mensch und Hund	64
Abb. 15	Relation der TT ₄ -Werte zum TSH bei Mensch und Hund	65
Abb. 16	Relative Bindungskapazität von T ₄ zu TBG bei verschiedenen Säugetieren.....	67
Abb. 17	CONTIG des TBG-Gens des Hundes mit humaner TBG Feedersequenz	69
Abb. 18	cDNA und Aminosäuresequenz des caninen TBG	70
Abb. 19	Sequenzvergleich des TBG-Promotors	72
Abb. 20	Schematische Darstellung der Umklonierung des humanen TBG-Promotors.....	74
Abb. 21	Analytische Gelelektrophorese zum Nachweis des erfolgreichen Restriktionsenzymverdaus von pCAT-hTP und pCat-Δ-hTP und des Shuttlevektors pBluescript mit HindIII und PstI	75
Abb. 22	Analytische Gelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Einklonierung von hTP bzw. Δ-hTP in den pBluescript Shuttlevektor.....	75

Abb. 23	Analytische Gelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Einklonierung von hTP bzw. Δ -hTP in den pGL4 Expressionsvektor.....	76
Abb. 24	TBG-Promotoraktivität mit aktiver und inaktiverter HNF-1 Bindungsstelle vom Menschen	78
Abb. 25	TBG-Promotoraktivität verschiedener HNF-1 Bindungsstellen	79
Abb. 26	Complete Deficiency Varianten des TBG durch Frameshift-Mutationen beim Menschen	86
Abb. 27	Strukturmodell der HNF-1 Bindungsstelle mit angelagertem HNF-1 α Dimer.....	89
Abb. 28	Alignment aller TBG-Aminosäuresequenzen.....	91
Abb. 29	Stammbaum des TBG.....	92

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Ursachen der Hypothyreose beim Hund.....	26
Tab. 2	Schilddrüsenfunktionsparameter von 658 Hunden	61
Tab. 3	Homologievergleich bekannter TBGs.....	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A (als Baustein der DNA)	Adenin
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
cTBG	canines Thyroxin-bindendes Globulin
cTP	caniner TBG-Promotor
cTSH	canines Thyreoidea-stimulierendes Hormon
Δ -hTP	inaktivierter humaner TBG-Promotor
dest.	destilliert
DIT	Dijodtyrosin
D-MEM	Zellkulturmedium (<i>Dulbecco's modified Eagles medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat (N=A, T, G, C)
DUOX	duale Oxygenase
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>acid</i>)
FCS	fötales Kälberserum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
FT ₃	freies Trijodthyronin
FT ₄	freies Thyroxin
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
G (als Baustein der DNA)	Guanin
Gs α	stimulatorisches α -G-Protein
h	Stunde
HepG2	eukaryotische Zelllinie HepG2
HNF-1	Hepatozyten Kernfaktor-1 (hepatocyte nuclear factor-1)
hTBG	humanes Thyroxin-bindendes Globulin
hTP	humaner TBG-Promotor
J	Jodid
kb	Kilobasenpaare (1 kb = 1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton; Dalton: Einheit der relativen Molekülmasse, entspricht der Masse eines Wasserstoffatoms (1,68 x 10 ⁻²⁷ kg)
lacZ	β -Galaktosidase-Gen
LH	luteinisierendes Hormon
min	Minute
M	Mol
mg	Milligramm
MIT	Monojodtyrosin
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
mTP	muriner TBG-Promotor
MW	Mittelwert

n	Anzahl
NIS	Natrium-Jodid-Symporter
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pCAT	Plasmid pCAT
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pGL4	Plasmid pGL4
RBP	Retinol-bindendes Protein
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDM	<i>site directed mutagenesis</i> , ortsgerichtete Mutagenese
T	Thymin
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Tetrajodthyronin (Thyroxin)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris/Borsäure/EDTA
TBPA	Thyroxin-bindendes Präalbumin
TG	Thyreoglobulin
TgAAk	Thyreoglobulin-Autoantikörper
TGB	Thyroxin-bindendes Globulin
TPO	Schilddrüsenperoxidase (thyroid peroxidase)
TRE	T ₃ -Rezeptor-Regulations-Elemente
Tris-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRH	Thyreotropin-releasing Hormon
TSH	Thyreidea stimulierendes Hormon = Thyreotropin
TSHR	TSH-Rezeptor
TT ₄	Gesamt-T ₄ (totales Thyroxin)
TTR	Transthyretin
U	Unit
UV	ultraviolett
(v/v)	Volumenanteil in Prozent
(w/v)	Konzentration in Prozent
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einführung

Das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) ist das wichtigste Transportprotein für Schilddrüsenhormone im Blut der meisten Säugetiere. Es besitzt zum einen eine außerordentliche hohe Bindungsaffinität zu Thyroxin (T₄) und Trijodthyronin (T₃), zum anderen eine große Spezifität für diese Moleküle. Zusammen mit Transthyretin (TTR) und Albumin bildet TBG ein Puffersystem, das zum einen die rasche Verfügbarkeit und den Transport von Schilddrüsenhormonen zu allen Geweben, zum anderen aber auch ihre mittel- und langfristige Speicherung sowie Minimierung ihrer renalen Elimination ermöglicht.

TBG wird ausschließlich in der Leber synthetisiert und von den Hepatozyten in die Blutbahn sezerniert. Die Expression wird durch eine Bindungsstelle für den Hepatozyten Kernfaktor-1 (hepatocyte nuclear factor-1, HNF-1) im Promotor des TBG-Gens reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wird die Schilddrüsenfunktion des Hundes charakterisiert und erstmals die Ursache für das Fehlen von TBG beim Hund mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen.

2 Einleitung

2.1 Die Schilddrüse des Hundes

2.1.1 Embryonale Entwicklung

Die erste Anlage der Schilddrüse entsteht als Epithelverdickung am Boden des Schlunddarmes. Der Spross dringt in die Tiefe des Mesoderms ein und biegt sich nach kaudal um, um sich dann zum *Ductus thyreoglossus* auszuwachsen. Als solcher weitet er sich an seinem freien Ende zu einem hufeisenförmigen, zweizipfligen Divertikel. Dies wandert an den Kehlkopfknorpeln vorbei nach kaudal bis vor die Trachea (Abb.1). Aus den Seitenteilen der Anlage bilden sich die beiden Lappen, aus dem Mittelstück der Isthmus. Der *Ductus thyreoglossus* wird zurückgebildet. Aus Resten können akzessorische Schilddrüsen z.B. am Zungenrund, am Hals oder im Thorax entstehen. Die zunächst rein epitheliale Anlage der Schilddrüse wird durch einwachsendes, gefäßhaltiges Mesenchym in Zellstränge und -platten zerlegt. Aus diesen bilden sich später die Schilddrüsenfollikel. Die Kalzitinin produzierenden, parafollikulären Zellen (C-Zellen) entwickeln sich aus dem ultimobranchialen Körper, der aus der 4. Schlundtasche entsteht und sich mit der Schilddrüsenanlage vereinigt.

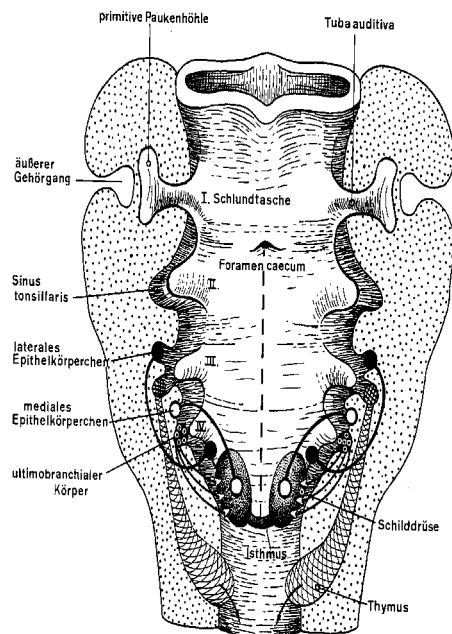


Abb. 1 Schematische Darstellung der Embryologie der Schilddrüse, der Epithelkörperchen und des Thymus.

(in Anlehnung an Starck 1975, aus: Schnorr 1989)

2.1.2 Makroskopische Anatomie

Die Schilddrüse, *Glandula thyreoidea*, besteht aus zwei bilateralsymmetrischen eigenständigen Lappen, dem *Lobus sinister* und *Lobus dexter* (Heller, 1932). Außer beim Menschen sind die beiden Lobi nur selten durch einen Isthmus, ein ebenfalls aus Drüsengewebe bestehendes Mittelstück, miteinander verbunden (Böhme, 1992; Grau, 1943; Heller, 1932). Dieser kommt nach Hullinger (Hullinger, 1993) vermehrt bei brachicephalen Hunderassen vor. Heller (Heller, 1932) stellte hingegen keine Rassedisposition fest. Die Schilddrüse hat eine glatte Oberfläche und ist braunrot gefärbt, jedoch ist die Farbe vom Blutfüllungszustand des Drüsengewebes abhängig. Ihre Form ist länglich-oval und dorsoventral leicht abgeflacht. Die Konsistenz reicht von weich bis mittelmäßig derb (Böhme, 1992; Grau, 1943). Der kaudale Pol läuft spitzer zu als der kraniale. Beide Lobi sind jeweils eingebettet in das oberflächliche Blatt der rechten bzw. linken tiefen Halsfaszie (*Fascia cervicalis profunda*), die in die dünne *Capsula thyreoidea* übergeht und mit dem lockeren Bindegewebe der Trachea verbunden ist (Hullinger, 1993). Die **Größe** der Schilddrüse variiert beträchtlich. Bei mittelgroßen Hunden beträgt die durchschnittliche Größe 6 x 1,5 x 0,5 cm. Nach Böhme (Böhme, 1992) schwankt das Gewicht normaler Schilddrüsen zwischen 0,6 und 23,3 g bzw. 40 - 400 mg/kg Körpergewicht. Grau (Grau, 1943) gibt ein Gewicht von 3 - 13 g an. Meissner (Meissner, 1924) konnte bei Zwerghunden ein relatives Schilddrüsengewicht von 316 mg/kg und 273 mg/kg bei anderen Hunden ermitteln. Reese et al. (Reese et al., 2005) stellten bei ihren Untersuchungen eine deutlich gegenläufige Tendenz der absoluten und relativen Schilddrüsengröße fest: bei steigendem Körpergewicht nimmt die absolute Schilddrüsengröße zu und das relative Volumen sinkt. Die beiden Lobi liegen jeweils auf einer Seite des Halses, kaudal vom Kehlkopf der Trachea an. Nach Grau (Grau, 1943) liegen die Lobi dorsolateral den Trachealspangen auf, Hullinger (Hullinger, 1993) hingegen richtet sie mehr lateroventral aus. Der kraniale Pol der Schilddrüse stößt an den Ringknorpel des Kehlkopfes und der kaudale Pol reicht individuell variierend vom fünften bis zum achten Trachealring (Böhme, 1992; Heller, 1932). Weiterhin beschreibt Heller (Heller, 1932) zusätzlich einige Lagevariationen. Da das Organ durch die *Musculi sternocephalicus*, *sternohyoideus* und *sternothyreoideus* bedeckt wird, ist es im gesunden Zustand nicht palpabel (Evans, 1993).

Die **Gefäßversorgung** der Schilddrüse ist ausgesprochen gut: In die Drüse treten aus unmittelbarer Umgebung zahlreiche Blutgefäße ein. Die Hauptgefäßversorgung erfolgt über

die stärkere *A. thyreoidea*, sie entspringt aus der *A. carotis communis* in Höhe des kranialen Poles der Schilddrüse. Bevor sie den Pol in einem kranial konvexen Bogen umkreist, gibt sie noch einen *R. pharyngeus*, einen *R. cricothyreoideus* und einen *R. laryngeus caudalis* in Richtung Pharynx und Kehlkopf ab, um dann mit mehreren Ästchen von der Ventralseite in die Drüse einzutreten. Die kleinere *A. thyreoidea caudalis* entspringt bei Fleischfressern dagegen schon im Ursprungsgebiet der Karotiden, oft mit einem gemeinsamen Stamm für das rechte und linke Gefäß aus dem *Truncus brachiocephalicus* (Böhme, 1992). Am kaudalen Pol der Schilddrüse teilt sie sich in ihre Endäste auf, die einerseits in die Drüse eindringen und andererseits mit den Ästen der *A. thyreoidea cranialis* anastomosieren. Die Anastomosen verteilen sich überwiegend über die dorsale, ein kleiner Teil auch über die ventrale Oberfläche der Schilddrüse. Sie verzweigen sich noch mehrmals, bevor sie in die Drüse eintreten (Hullinger, 1993). Nach Böhme (Böhme, 1992) gibt die *A. thyreoidea cranialis* beim Hund einen *Ramus ventralis* und einen *Ramus dorsalis* an die Schilddrüse ab.

Der **venöse Blutabfluss** ist durch die drei *Venae thyreoideae cranialis, medialis* und *caudalis* gewährleistet, wobei letztere meist nur auf der linken Seite vorhanden ist. Die beiden erstgenannten Venen münden in die *V. jugularis interna* und entsorgen die ihrem Namen entsprechenden Gebiete der Schilddrüse. Die einseitige *V. thyreoidea caudalis* ist nur beim Fleischfresser ausgebildet und geht meistens in die *V. brachiocephalica sinistra* über, selten in die *V. brachiocephalica dextra* (Böhme, 1992).

Die **Lymphgefäße** der Schilddrüse laufen laut Rienhoff (Rienhoff, 1938) parallel zu den Blutgefäßen und bilden an der Oberfläche unter der Kapsel einen *Plexus lymphaticus*. Breite Lymphgefäße leiten die Lymphe aus dem kranialen Teil der Drüse zum *Lymphonodus cervicalis profundus cranialis* ab. Rienhoff (1938) schätzt, dass in 10% der Fälle eine kollaterale Lymphzirkulation *via* Lymphgefäßanastomosen zwischen den beiden Schilddrüsen existiert. Der Lymphabfluss aus dem kaudalen Teil der Schilddrüse erreicht den *Lymphonodus cervicalis profundus caudalis*. Verbindungen bestehen auch mit dem *Ductus lymphaticus* auf der rechten und dem *Ductus trachealis* auf der linken Seite (Böhme, 1992; Rienhoff, 1938).

Die **Innervation** der Schilddrüse erfolgt durch den *N. thyreoideus*. Dieser ist ein gemischter Nerv, d.h. die sympathische Komponente besteht aus Nervenfasern, die aus dem *Ganglion cervicale sive superior* entspringen. Die parasymphatischen Fasern erhält der Nerv vom *N. laryngeus cranialis* oder von dessen *Ramus externus* (Böhme, 1992; Nonidez, 1931). Der Verlauf des *N. thyreoideus* ist unterschiedlich: Entweder verläuft er als unabhängiger Nerv bis

zum Erreichen der Schilddrüse oder er ist mit einem Nervenbündel des Plexus der *A. carotis communis* verbunden und trennt sich von diesem erst auf der Höhe der *A. thyreoidea cranialis*. Häufig verzweigt sich der Nerv zusammen mit den *Rami glandulares* dieses Gefäßes, nachdem er in die Schilddrüse eingetreten ist. Da am Eintrittsort der recht großen *A. thyreoidea cranialis* und des *N. thyroideus* auch die *V. thyreoidea cranialis* austritt, bezeichnet Nonidez (Nonidez, 1931) diesen als „Hilus“ der Drüse. In selteneren Fällen kann der Nerv aber auch, nachdem er in den Nervenplexus der *A. thyreoidea cranialis* eingegangen ist, an der medialen Oberfläche der Drüse entlanglaufen, um dann in der Mitte zwischen kranialem und kaudalem Pol des Lappens in die Drüse einzutreten (Nonidez, 1931). Die Beteiligung des *N. laryngeus recurrens* an der Innervation der Schilddrüse ist nicht eindeutig geklärt, da einerseits keine direkten Fasern dieses Nervs zur Drüse gefunden werden können, eine Stimulation dieses Nervs aber sichtbare, z.T. vasodilatatorische, z.T. vasokonstriktorische Effekte auf die Schilddrüsengefäße hat. Eventuell erreichen die Fasern dieses Nervs die *Rami glandulares* der *A. thyreoidea cranialis* auf Umwegen, wie z.B. die Verbindung des *N. laryngeus recurrens* mit dem *Ramus externus* des *N. laryngeus cranialis* (Böhme, 1992; Nonidez, 1931).

Akzessorisches Schilddrüsen Gewebe ist manchmal entlang der Trachea zu finden und wird gelegentlich mit dem embryonalen Herzabstieg in den Brustraum verlagert (Dyce, 1991). Mehr als fünf Prozent aller Hunde sollen ektopes Schilddrüsen Gewebe besitzen. Dieses Gewebe soll sich entsprechend der embryonalen Entwicklung am häufigsten in der Nähe des Zungenbeines, entlang des cervikalen Teiles der Trachea und an der Basis der Aorta befinden (Evans, 1993).

2.1.3 Mikroskopische Anatomie

Die Schilddrüse wird von einer dünnen bindegewebigen Kapsel (*Capsula thyroidea*) umhüllt, von der schmale Bindegewebssepten ins Innere ziehen und das Organ in Lappen (*Lobi*) und Läppchen (*Lobuli*) unterteilt. Funktionseinheit der Thyreoidea sind die Schilddrüsenfollikel (*Folliculi thyroideae*). Diese bilden zusammen mit dem interlobulären und interfollikulären Gewebe das Parenchym der Schilddrüse (Liebich, 1993). Das interlobuläre und das interfollikuläre Gewebe besteht aus retikulären Fasern, einem ausgedehnten kapillaren Netzwerk und lymphatischen Gefäßen, die allesamt von der Peripherie über die oben genannten Bindegewebssepten zentripetal geleitet werden (Hullinger, 1993). Die Schilddrüsenfollikel sind Bläschen, deren Wand aus einem

einschichtigen Epithel besteht, wobei die Größe und Form der Bläschen und der Epithelzellen (*Endocrinocyti folliculares*) funktionsabhängig variieren. Die Zellen bilden die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T_3) und Tetrajodthyronin (Thyroxin, T_4), die im Kolloid im Inneren der Schilddrüsenfollikel an das Thyreoglobulin (TG) gebunden sind. Das jodreiche, homogene Kolloid, das im Inneren der Schilddrüsenfollikel gespeichert wird, ist die intrathyreoidale Speicherform der Schilddrüsenhormone. Die Schilddrüsenzellen sind je nach Funktionszustand iso- bis hochprismatisch (Synthese- und Resorptionsphase) oder abgeflacht (Speicherphase). Die freie Zelloberfläche weist Mikrovilli und pseudopodienähnliche Fortsätze auf, die beim Stoffaustausch zwischen Epithelzelle und Follikellumen eine Rolle spielen (Liebich, 1993). Es existieren zahlreiche Fenestrierungen im Follikelepithel, die den Abtransport der Hormone in die Blutbahn erleichtern. Zum Teil stehen Epithelzellen zweier benachbarter Follikel in direktem Kontakt zueinander ohne follikuläres Gewebe (Fujita und Murakami, 1974).

In der Schilddrüse befinden sich auch die C-Zellen, die auch parafollikuläre Zellen genannt werden. Sie können einzeln oder in Gruppen intraepithelial in der Peripherie der Schilddrüsenfollikel lokalisiert sein. Sie reichen nicht bis in das Follikellumen hinein, weisen aber eine gemeinsame Basalmembran mit den Epithelzellen auf. Die C-Zellen produzieren und speichern im wesentlichen Kalzitinin, aber auch Serotonin, Somatostatin und Dopamin (Liebich, 1993; Roediger, 1973). Sie haben keine Bedeutung für die Funktion der Schilddrüse, sondern für den Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel.

2.2 Physiologie

Hormone sind im Organismus das Bindeglied zwischen dem zentralen Nervensystem (ZNS) und den peripheren Organen. Sie ermöglichen dem Organismus innerhalb kürzester Zeit aber auch langfristig auf veränderte innere und äußere Bedingungen zu reagieren. Dabei handelt es sich sowohl um kurzfristig schwankende Rhythmen, wie z.B. dem zirkadianen Rhythmus aber auch um langfristige Prozesse, wie im Falle des Sexualzyklus oder des Alterungsprozesses. Die Funktion der Schilddrüse ist es, je nach Bedarf die jodhaltigen Hormone Thyroxin und Trijodthyronin für die Körperzellen bereitzustellen.

2.2.1 Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone

Für die Bildung der Schilddrüsenhormone ist die mit der Nahrung aufgenommene Jodmenge von wesentlicher Bedeutung. Jod wird im Gastrointestinaltrakt zu Jodid (J) reduziert und in die Blutzirkulation aufgenommen. Der tägliche Jodbedarf eines 10 bis 15 kg schweren Hundes liegt bei mindestens 140 µg und ist bei Fütterung eines vollwertigen, kommerziellen Futters vollständig gedeckt (Belshaw et al., 1974; Lawler et al., 2006). Meyer (Meyer, 1990) unterscheidet zwischen dem Bedarf von einem Hund mit physiologischem Stoffwechsel (12 µg/kg/d) und dem von Hunden mit erhöhtem Stoffwechsel, wie z.B. in der Gravidität (25 µg/kg/d). Jungtiere weisen eine höhere Sekretionsrate von Schilddrüsenhormonen auf als erwachsene Tiere. Dies hängt mit den erhöhten Stoffwechsellanforderungen während des Wachstums zusammen. Ebenso bewirkt ein hoher Proteingehalt im Futter eine erhöhte Exkretion von Schilddrüsenhormonen und führt damit zu einer vermehrten Wärmeabgabe der Tiere (Bamberg, 1987). Kienzle und Hall (Kienzle, 1997) weisen im Gegensatz zu der Meinung von Belshaw et al. (1975), auf zu niedrige Jodgehalte in den Futtermitteln hin.

Das im Blut zirkulierende Jodid wird über den Natrium-Jodid-Symporter (NIS) größtenteils in die Schilddrüse aufgenommen und kann um das 10- bis 200-fache der Serumkonzentration angereichert werden (Abb. 2). Auch andere Gewebe wie Speicheldrüse, Niere, Magen, Gesäuge, Ziliarkörper und *Plexus chorioideus* des Auges können Jodid aufnehmen, aber sie speichern es nicht in größeren Mengen (Peterson und Ferguson, 1989). Der für die Aufnahme von Jodid notwendige Natriumgradient wird im Austausch gegen Kalium durch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten. Nach Diffusion durch die Zelle wird das Jodid vom Pendrin in das Kolloid des Schilddrüsenfollikels weitertransportiert. Dort erfolgt die Umwandlung von Jodid in elementares Jod durch die Schilddrüsenperoxidase (thyroid peroxidase, TPO). Auch die Kopplung des Jods an Tyrosinreste des Thyreoglobulin (TG) erfolgt durch die Schilddrüsenperoxidase. Die für beide Schritte erforderlichen freien Sauerstoffradikale werden als H_2O_2 von der dualen Oxygenase (DUOX) bereitgestellt. Am Thyreoglobulin entstehen durch die Jodierung Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT), die durch Kopplung, enzymatisch ebenfalls durch die Schilddrüsenperoxidase katalysiert, in T_3 und T_4 umgewandelt werden. T_3 und T_4 bleiben dabei zunächst an das TG gebunden, das als intrakolloidaler Speicher der Schilddrüsenhormone fungiert. Das Thyreoglobulin wird bei Bedarf durch Pinozytose in die Schilddrüsenzelle aufgenommen und dort durch proteolytischen Abbau durch lysosomale Enzyme verdaut. Das in der Schilddrüsenzelle freigesetzte T_3 und T_4 wird dann bei Bedarf in das Blut sezerniert. Zum Teil werden in der

Zelle auch MIT und DIT als nicht gekoppelte Tyrosinreste freigesetzt, aus denen das Jod mittels der Dehalogenase in einem Salvageprozess wieder in den Kreislauf eingeführt wird, um vom Pendrin erneut ins Kolloid sezerniert zu werden. Alle Transport- und Syntheseschritte unterliegen der Regulation durch Thyreoidea stimulierendes Hormon (Thyreotropin, TSH), das seine Wirkung über den TSH-Rezeptor (TSHR) und Aktivierung stimulierender alpha-G-Proteine (G_{α}) vermittelt. Bei ausreichender Jodaufnahme liegt das Verhältnis von gespeichertem T_4 zu T_3 bei der menschlichen Schilddrüse bei 12:1, Angaben hierzu zum Hund liegen nicht vor. Bei einem Joddefizit oder einem drohenden Schilddrüsenversagen wird dagegen durch eine Autoregulation mehr aktives T_3 gebildet (Fugazzola et al., 2001; Köhrle und Petrides, 2007; Peterson und Ferguson, 1989).

Im Gegensatz zum gespeicherten Verhältnis beträgt das Verhältnis von sezerniertem T_4 zu T_3 beim Menschen nur 4:1 (Peterson und Ferguson, 1989). Erst in der Peripherie wird das Prohormon T_4 in den verschiedenen Geweben durch enzymatische Dejodination in das aktive T_3 ($5'$ -Dejodase) oder in das hormonell inaktive reverse T_3 (5-Dejodase) umgewandelt (Abb. 3). Die Umwandlung von T_4 mittels $5'$ -Dejodierung in T_3 (T_3 -Neogenese) findet vorwiegend in den Nieren und der Leber statt.

Die Schilddrüsenhormone sind lipophile, wasserunlösliche Verbindungen und können daher im Blut nur an spezifische Trägerproteine gebunden zirkulieren. Die Bindung an Transportproteine wird von Medikamenten und Krankheiten, die eine Wirkung auf den Gesamt-Protein-Gehalt des Blutes besitzen, stark beeinflusst. Freies T_4 und T_3 (FT_4 , FT_3) zirkulieren im Blut nur in winzigen Mengen. Nach Kraft und Dietl (Kraft und Dietl, 1994) macht FT_4 nur 0,1-0,3% des Gesamt- T_4 aus. FT_4 und FT_3 stellen die Schilddrüsenhormonfraktion dar, die zur Aufnahme in Geweben zur Verfügung steht, um in den Zielzellen ihre hormonelle Wirkung zu entfalten (Voigt, 1994).

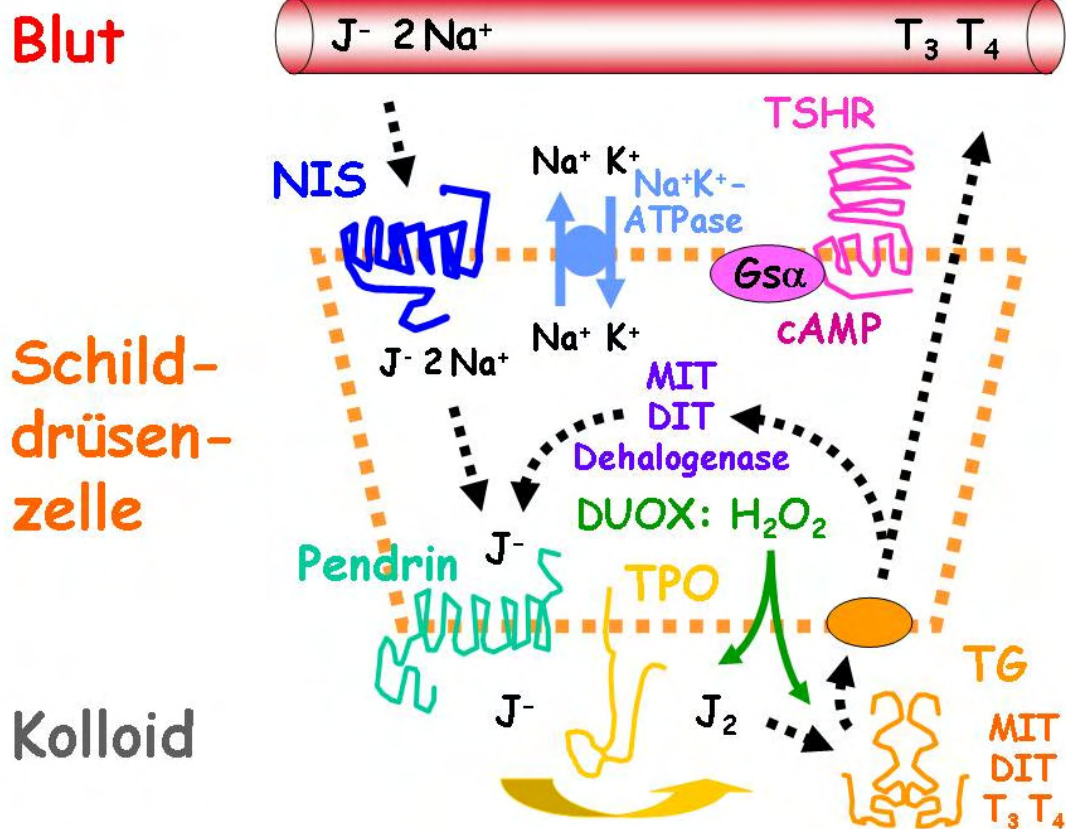


Abb. 2 Synthese der Schilddrüsenhormone in einem Schilddrüsenfollikel.

Der Natrium-Jodid-Symporter (NIS) transportiert Jodid (J^-) im Ko-transport mit zwei Natriumionen (Na^+) aus dem Blut in die Schilddrüsenzelle. Die hohe Jodidextraktion aus dem Blut wird durch den Natriumgradienten erzielt, der durch die Natrium-Kalium-Adenosintri-phosphatase ($Na^+ / K^+ - ATPase$) aufrechterhalten wird. Der Weitertransport von Jodid in das Follikellumen erfolgt durch das Pendrin. Die an der apikalen Zellmembran der Schilddrüsenzelle angelagerte Schilddrüsenperoxidase (thyroid peroxidase, TPO) wandelt Jodid in elementares Jod (J_2) um, jodiert Tyrosinreste am intraluminal im Kolloid gespeichertem Thyroglobulin (TG) und koppelt das so entstehende Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT) aneinander, um noch an das TG gebundenes, Trijodthyronin (T_3 , aus MIT und DIT) und Tetrajodthyronin (=Thyroxin, T_4 , aus zwei DIT) zu synthetisieren. Das für diese Reaktionen erforderliche Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird von der Dualen Oxigenase (DUOX) bereitgestellt. Bei Bedarf wird das TG durch Pinozytose aufgenommen und lysosomal gespalten. Das dabei freiwerdende T_3 und T_4 wird sezerniert, das z.T. ebenfalls freiwerdende MIT und DIT wird durch die Dehalogenase dejodiert, um das Jodid wieder in den Synthesekreislauf einzuschleusen. Die Regulation aller Vorgänge erfolgt durch Aktivierung des TSH-Rezeptors (TSHR) über ein stimulatorisches α -G-Protein ($Gs\alpha$) abhängige Synthese vom zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) (modifiziert nach Fugazzola 2001).

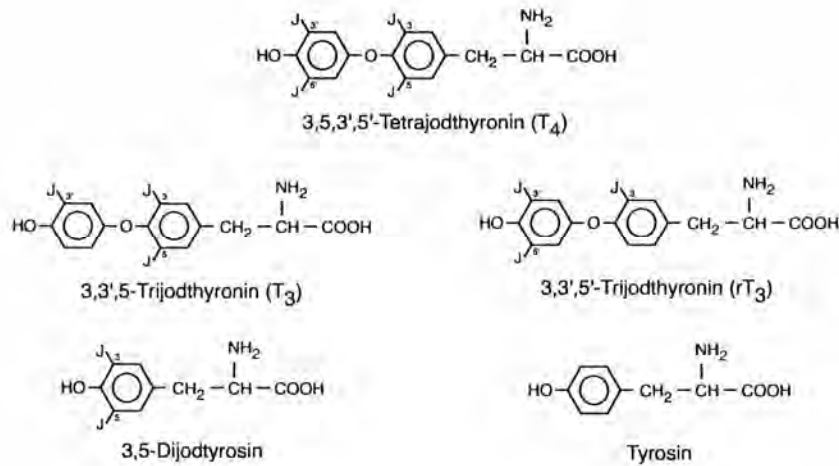


Abb. 3 Chemische Strukturformeln des Thyroxin (T₄), seiner Derivate Trijodthyronin (T₃) und reverses T₃ (rT₃) sowie seiner Vorstufen Dijodtyrosin und Tyrosin.

2.2.2 Regulation der Schilddrüsenfunktion

Die Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone unterliegt der Steuerung in einem Regelkreis. Aus den thyreotropen Arealen des Hypothalamus wird das Tripeptid Thyreotropin-releasing Hormon (TRH) in den hypophysären Portalkreislauf sezerniert. Dieses speziesunspezifische Tripeptid wird, neben anderen regulatorischen Polypeptiden, in den paraventriculären Kerngebieten des Hypothalamus synthetisiert und pulsativ abgegeben (Liebich, 1993). Das TRH wirkt auf die thyreotropen Zellen der Adenohypophyse und somit auf die Produktion des thyreotropen Hormons (TSH) (Peterson und Ferguson, 1989). Das ebenfalls im Hypothalamus produzierte Somatostatin wirkt dagegen hemmend auf die Sekretion von TSH. TSH beeinflusst die Morphologie und die Funktion der Schilddrüse, indem es die Blutversorgung der Schilddrüse erhöht sowie die Synthese und die Sekretion von T₃ und T₄ stimuliert. TSH fördert weiterhin die Aufnahme von Jod und die Sekretion von Thyreoglobulin in das Follikellumen (Voigt, 1994). Unter physiologischen Bedingungen wird die Synthese und Sekretion von TSH in erster Linie über eine negative Rückkopplung (negatives Feedback) durch die Konzentrationen der freien Schilddrüsenhormone Thyroxin (FT₄) und Trijodthyronin (FT₃) gesteuert (Abb. 4), während der hypothalamischen Kontrolle durch TRH nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt (Ferguson, 1994).

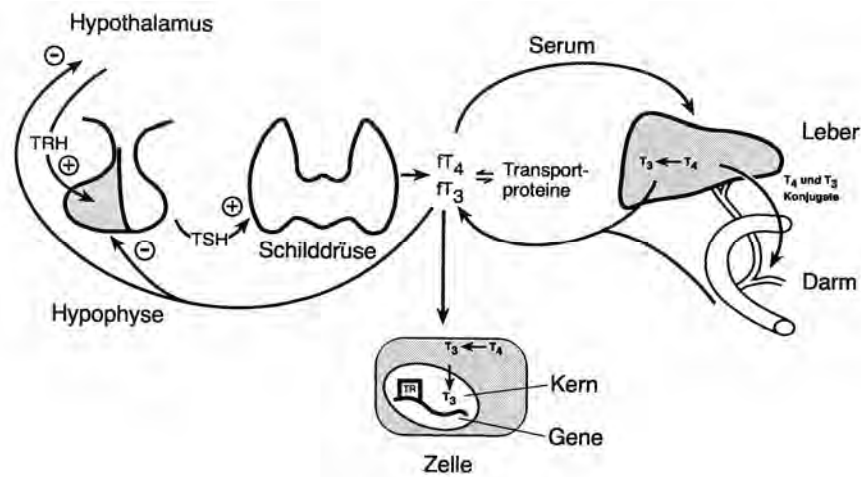


Abb. 4 Regelkreis der Schilddrüsenhormone (aus Jameson, 1998).

Als übergeordnetes Zentrum schüttet der Hypothalamus bei Bedarf Thyreotropin-releasing Hormon (TRH) aus, das in der Hypophyse die Ausschüttung von Thyreotropin (= TSH, Thyreoidea stimulierendes Hormon) anregt. TSH stimuliert vielfältige Vorgänge in der Schilddrüse, die zu einer vermehrten Sekretion der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 führen. Nur deren freie Anteile (freies T_3 , fT_3 und freies T_4 , fT_4) sind biologisch aktiv, der größte Teil ist als Speicher an Transportproteine gebunden. fT_3 und fT_4 stehen im Gleichgewicht mit schilddrüsenhormonabhängigen Zellen, in denen T_3 direkt und T_4 nach Umwandlung in T_3 an den intranukleären Schilddrüsenhormonrezeptor (TR, thyroid hormone receptor) bindet, um die Genexpression zu regulieren. Die freien Hormone stehen auch im Äquilibrium mit der Konjugation und Ausscheidung von T_3 und T_4 über Leber und Darm.

Bei einer Erhöhung der T_4 -Konzentration im Blut wird der frei zirkulierende Anteil des T_4 vermehrt in die Hypophysenzellen aufgenommen, um dann nach 5'-Dejodination als T_3 die Expression negativ regulierter Gene zu hemmen, wie z.B. des TSH-Gens. Bei einer Erhöhung der fT_4 -Spiegel, also einer Hyperthyreose, wird die TSH-Synthese und die Freisetzung teilweise oder vollständig unterdrückt. (Voigt, 1994). Umgekehrt kommt es bei einem Abfall der fT_4 -Spiegel im Blut, also einer Hypothyreose, zu einem Anstieg der TSH-Synthese und Freisetzung. Mit den erhöhten TSH-Spiegeln versucht der Organismus durch Stimulierung der Schilddrüsenhormonsynthese wieder eine euthyreote Stoffwechsellage herzustellen. Eine lang anhaltende Erhöhung von TSH hat zusätzlich eine Proliferation der Schilddrüsenzellen zur Folge.

Die TSH-Sekretion und somit die Produktion und Freisetzung von Trijodthyronin und Thyroxin unterliegen außerdem einem zirkadianen und einem jahreszeitliche bedingten Rhythmus. Die TSH-Konzentration erreicht im Winter ihren Maximalwert. Bei niedrigen

Umgebungstemperaturen oder bei Abkühlung der Tiere erhöht sich die TSH-Sekretion, die Thyroxin-Konzentration steigt an, der Grundumsatz des Organismus wird gesteigert und dementsprechend vermehrt Wärme gebildet. Somit kann bei niedrigen Umgebungstemperaturen die physiologische Körpertemperatur aufrechterhalten werden (Bamberg, 1987).

Neben der Regulation der Schilddrüsenfunktion durch TSH existiert noch ein weiterer Regelmechanismus durch die Jodidkonzentration im Blut. Liegt eine niedrige Jodidkonzentration vor, so werden durch die Autoregulation sowohl die Aufnahme von Jod aus dem Magen-Darm-Trakt als auch die Hormonsynthese stimuliert, auch dann, wenn TSH fehlt. Bei hohen Jodidkonzentrationen wird die Aufnahme von Jodid durch den Natriumjodidsympporter und Hormonproduktion in der Schilddrüse gehemmt (Plummerung) (Voigt, 1994).

2.2.3 Wirkung der Schilddrüsenhormone

Schilddrüsenhormone beeinflussen den Intermediärstoffwechsel und sind somit notwendig für das Wachstum und die Reifung von Geweben, die Zellatmung und den Grundumsatz. Sterling (Sterling, 1979a) und Oppenheimer et al. (Oppenheimer et al., 1994) gehen davon aus, dass die Wirkung der Jodothyronine in erster Linie durch Interaktion mit dem Zellkern vermittelt wird. Daneben spielen aber auch extranukleäre, nichtgenomische Mechanismen wie Wechselwirkungen mit der Plasmamembran, mit zytoplasmatischen Proteinen und vor allem mit den Mitochondrien eine Rolle (Sterling, 1979a, 1979b). Die Schilddrüsenhormone wirken in physiologischen Mengen katabol durch ihren Einfluss auf zahlreiche metabolische Prozesse (Peterson und Ferguson, 1989). Sie wirken z.B. auf die Konzentration und Aktivität von einigen Enzymen und Hormonen, verändern den Stoffwechsel vieler Substrate, Vitamine und Mineralien. Darüber hinaus aktivieren sie die Gluconeogenese, die Glycogenolyse und die Liponeogenese und steigern die Expression der Gene der Na^+/K^+ -ATPase. Dadurch steigt der Sauerstoffverbrauch der Gewebe und die bei der ATP-Spaltung in Form von Wärme freiwerdende Energie trägt wesentlich zur Thermoregulation bei. Durch Stimulation der Biosynthese von Wachstumshormon in der Hypophyse und durch Osteoblasten und Osteoklasten vermittelten direkten Einfluss auf den Knochen fördert T_3 das Wachstum. Schilddrüsenhormone besitzen auch eine Schlüsselfunktion bei Differenzierungsvorgängen wie z.B. der Hirnentwicklung von Neonaten durch Förderung der Dendritenbildung und Myelinisierung (Feldman, 1996; Jones et al., 2003; Köhrle und Petrides, 2007; Richardson et

al., 2005). Ein Hormonmangel in der Fetalzeit führt zu den unter dem Begriff Kretinismus bekannten irreversiblen Schäden (Ekins et al., 1994).

Eine Verringerung des peripheren Gefäßwiderstandes und eine positiv chronotrope und inotrope Wirkung am Herzen werden ebenfalls durch T_3 vermittelt. Darüber hinaus sind die Schilddrüsenhormone für eine normale Funktion fast aller Prozesse im Körper wichtig, so auch für die Reproduktionsfähigkeit sowohl von weiblichen als auch männlichen Individuen. Die Wirkung der Schilddrüsenhormone wird ausschließlich von dem ungebundenen Anteil der Hormone vermittelt. Wahrscheinlich werden diese sowohl passiv durch Diffusion als auch aktiv durch einen Carrier-vermittelten Transport in die Zelle aufgenommen. Die eigentliche Wirkung, die Regulation der Expression von Genen, wird über nukleäre T_3 -Rezeptoren vermittelt (Abb. 5).

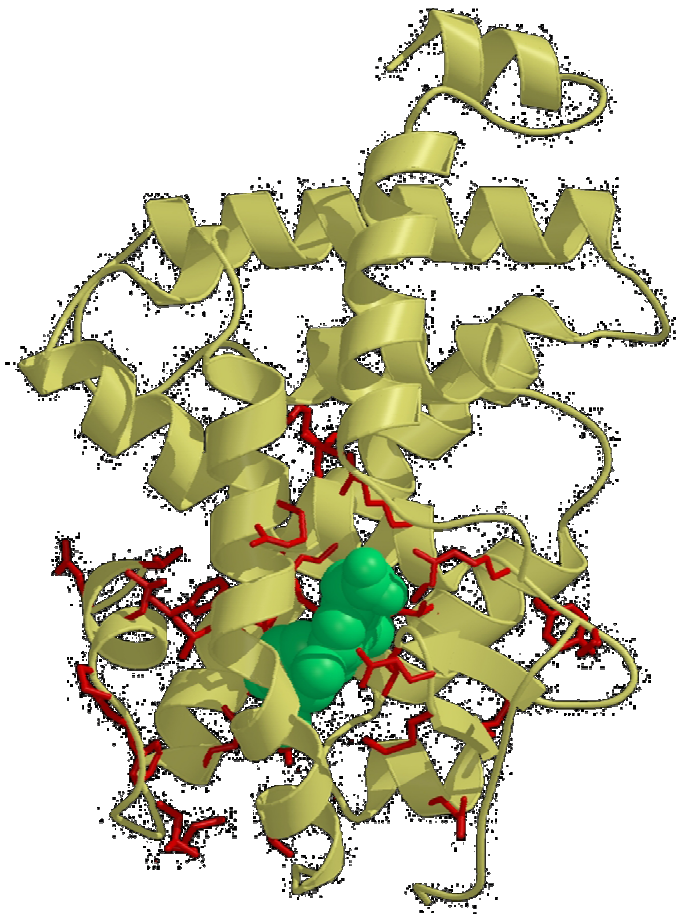


Abb. 5 Struktur des Schilddrüsenhormonrezeptors TR-β1.

T_3 ist grün, TR gelb und bekannte Mutationen sind rot gekennzeichnet (aus Wagner et al. 1995 (Wagner et al., 1995)).

Man unterscheidet α - und β - Rezeptoren mit jeweils drei Unterarten (α_1 , α_{2vI} und α_{2vII} sowie β_1 , β_2 und β_3). Diese Schilddrüsenhormonrezeptoren kommen in den Geweben in unterschiedlicher Menge vor (Abb. 6). Neuere Daten weisen darauf hin, dass die Expression der verschiedenen TRs auch speziesspezifisch sehr unterschiedlich ist (Blange et al., 1997). Zur Verteilung der verschiedenen TRs im Hundeherz gibt es Daten von Shahrara et al., die allerdings nur TR- α_2 , TR- β_1 und TR- β_2 , jedoch nicht TR- α_1 untersuchten und damit im Vergleich zum Menschen schwer zu interpretieren sind, bei denen der TR- α_1 im Herzen am wichtigsten ist (Shahrara et al., 1999).

Der wichtigste und am besten untersuchte Schilddrüsenhormonrezeptor ist der TR- β_1 , der in fast allen schilddrüsenhormonabhängigen Geweben vorkommt und in Abhängigkeit von Kofaktoren sowohl eine negative wie positive Regulation der Genexpression bewirken kann (Liu et al., 2006; Rentoumis et al., 1990). Nur die Hypophyse hat außerdem noch den nahe verwandten TR- β_2 , so dass die TSH-Expression zum Teil unabhängig von der Regulation peripherer Gewebe gesteuert wird. Eine weitere Ausnahme bildet das Herz, das im Wesentlichen nicht von TR- β , sondern von TR- α_1 gesteuert wird. Dies hat eine überragende Bedeutung bei der Schilddrüsenhormonresistenz (RTH, resistance to thyroid hormone) erlangt (Refetoff, 1982 und 2003). Da die Resistenz nur den TR- β betrifft ($\beta_1 + \beta_2$), sind alle Gewebe hypothyreot, bis auf das Herz, das von der Resistenz nicht betroffen und somit hyperthyreot reagiert, erkennbar an der bei RTH häufigen Tachykardie. Der TR- α_2 , der in zwei Varianten vorkommt, ist kein echter Rezeptor, da er zwar an DNA binden kann, aber keine funktionierende T₃-Bindungsstelle hat, also nicht aktiviert werden kann. Seine Funktion ist noch weitgehend unklar, möglich ist eine Bedeutung als „Silencer“, also zur Unterdrückung der Aktivierung durch die anderen Rezeptoren (Xu und Koenig, 2005). Tatsächlich haben alle Gewebe sehr viel mehr TR- α_2 als andere TRs. Ein dritter Schilddrüsenhormonrezeptor, früher TR- β_3 , mittlerweile aber TR- β_0 genannt, ist bisher nur bei Ratten beschrieben worden und spielt bei deren Knochenwachstum eine Rolle (Mengeling et al., 2005).

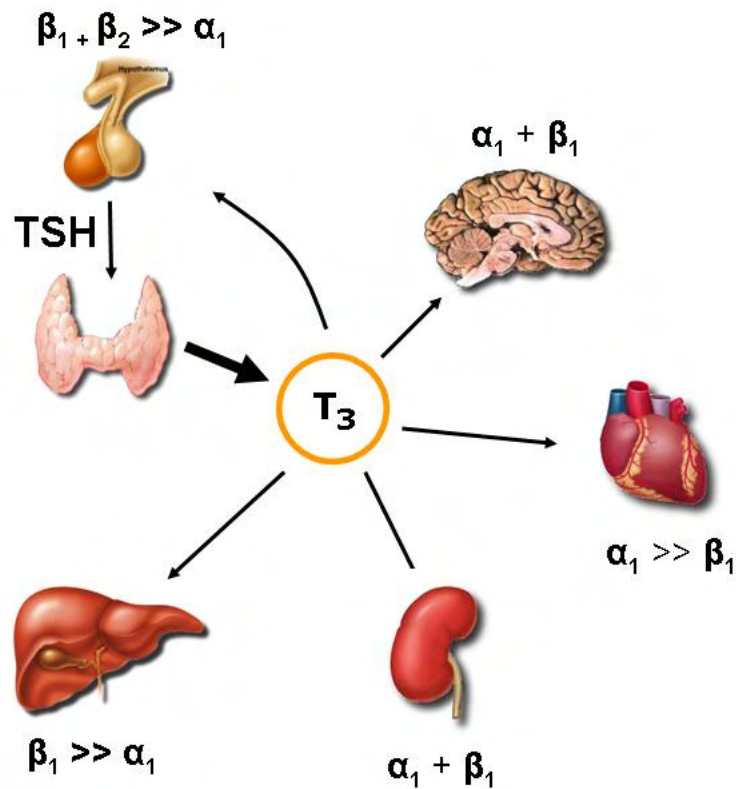


Abb. 6 Expression der α - und β -Schilddrüsenhormonrezeptoren in verschiedenen Geweben. (modifiziert nach Janssen 1998).

Im Promotorbereich von Genen sind T_3 -Rezeptor-Regulations-Elemente (TRE) lokalisiert. Zur Aktivierung der Genexpression bindet ein Heterodimer aus T_3 -Rezeptor mit gebundenem T_3 und einem Hilfsprotein, z.B. dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) an das TRE (Abb. 7 ①). Bei manchen Genen ist zuvor eine Aufhebung der Inaktivierung durch Ablösen eines TR-Homodimers erforderlich, die ebenfalls durch Bindung von T_3 verursacht wird (Abb. 7 ②). Anschließend kommt es dann zur weiteren Aktivierung durch Bindung eines TR-RXR Heterodimers (Abb. 7 ③) (Janssen, 1998).

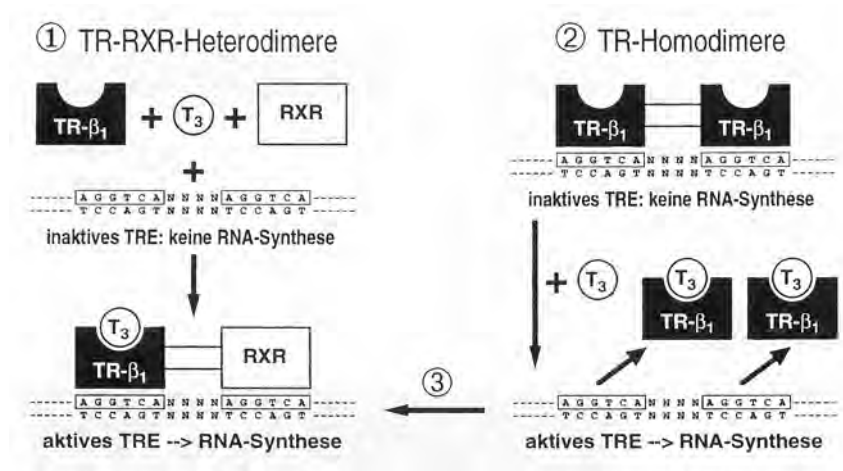


Abb. 7 Aktivierung der Genexpression durch Schilddrüsenhormone.

① Aktivierung: Durch Bindung von T₃ und eines Retinoid-X-Rezeptors (RXR) an den Schilddrüsenhormon-Rezeptor-β₁ (TR-β₁) entsteht ein Heterodimer, das durch Anlagerung an ein T₃-Rezeptor-Regulationselement (TRE) einen auf der DNA dahinter liegenden Promotor aktiviert und bei positiv regulierten Genen zur RNA-Synthese führt. ② Aufhebung einer Inaktivierung: Bei einigen Genen ist zunächst eine Inaktivierung durch ein an das TRE angelagertes TR-β₁ Homodimer aufzuheben. Dies erfolgt durch Bindung von T₃, das das Homodimer aufspaltet und von TRE ablöst. ③ Anschließend kann dann eine weitere Aktivierung durch Anlagerung eines Heterodimers wie bei ① erfolgen (aus Janssen et al. 1998).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Schilddrüsenhormone den Stoffwechsel und die Funktion zahlreicher Organe und somit den Gesamtorganismus beeinflussen, indem sie den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel stimulieren. Hieraus resultiert die große Vielfalt der Symptome bei Schilddrüsendysfunktionen (Kraft, 1990; Oppenheimer et al., 1994).

2.2.4 Abbau der Schilddrüsenhormone

Die Plasma-Halbwertszeit von T₄ beim Hund wird von Furth et al. (Furth et al., 1968) auf 10 bis 16 Stunden (beim Mensch 7 Tage), die von T₃ auf 5 bis 6 Stunden (beim Mensch 24 bis 36 Stunden) geschätzt (Belshaw et al., 1975; Ferguson, 1984; Forth, 2001). Der Abbau der Schilddrüsenhormone erfolgt über die sukzessive Dejodierung und einer Konjugation zu löslichen Glukuroniden und Sulfaten, die über Galle und Urin ausgeschieden werden (Abb. 8).

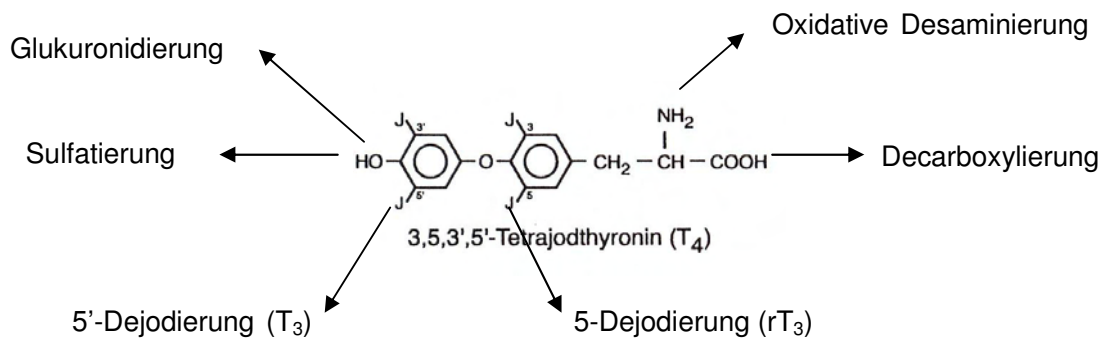


Abb. 8 Abbau der Schilddrüsenhormone.

Der Abbau der Schilddrüsenhormone erfolgt durch Glukuronidierung oder Sulfatierung der Hydroxylgruppe, 5'- und 5-Dejodierung sowie Desaminierung oder Decarboxylierung der Aminosäuregruppe.

Beim Hund werden pro Tag 50% des T₄ und ca. 30% des T₃ über die Galle im Kot ausgeschieden. Der Anteil des T₄, der aus dem Darm wieder resorbiert wird, ist beim Hund viel geringer als beim Menschen (Belshaw, 1983). Die restlichen 20% werden durch oxidative Desaminierung und Decarboxylierung in Leber oder Nieren zu Tetra- und Trijodthyreoacetat abgebaut, das vor seiner endgültigen Ausscheidung noch dejodiert wird. Die tägliche Abbauraten der Schilddrüsenhormone wird nicht durch die Transportproteine beeinflusst, sondern korreliert direkt mit der Konzentration an freien Schilddrüsenhormonen (Bellabarba et al., 1968).

2.2.5 Die Hypothese der freien Hormone (free-hormone-hypothesis)

Die free-hormone-hypothesis besagt, dass die biologische Aktivität nur von dem ungebundenen Teil der Hormone bestimmt wird (Robbins und Rall, 1957). Eine zelluläre Aufnahme der Schilddrüsenhormone kann bei an Serumproteine gebundenen Hormonen nicht erfolgen. Sowohl Hillier als auch Mendel et al. konnten anhand der Perfusion von Rattenlebern mit Schilddrüsenhormonen die free-hormone-hypothesis bestätigen (Hillier, 1971; Mendel et al., 1987). So erfolgt die Aufnahme von freiem Thyroxin sofort in diejenigen Leberzellen, die zuerst mit ihnen in Kontakt treten, später mit dem Serum in Kontakt getretene Zellen werden nicht mehr versorgt (Mendel et al., 1987). Bei der Perfusion von Rattenlebern mit freien oder proteingebundenen Schilddrüsenhormonen kommt es umgehend zu einer Aufnahme der freien Hormone durch die Hepatozyten, während die Aufnahme der

gebundenen Hormone verzögert ist (Hillier, 1971). Vergleichende Untersuchungen von Ratten ohne Albumin und Mäusen ohne Transthyretin mit normalen Kontrolltieren bestätigen diesen Mechanismus (Mendel, 1989; Palha et al., 1994). Trotz des Fehlens eines wichtigen Transportproteins sind die Tiere euthyreot, die Aufnahme der Schilddrüsenhormone in die Zellen erfolgt unverändert. Die tatsächlich aufgenommene T₄-Menge ist demnach von der freien T₄-Konzentration abhängig. Durch die Bindung der Hormone an Serumproteine ist deren gleichmäßige Verteilung erleichtert und ein größerer Speicher vorhanden.

2.2.6 Schilddrüsenhormontransport im Blut

Die Schilddrüsenhormone sind lipophile, somit wasserunlösliche Verbindungen und werden durch die Bindung an Plasmaproteine transportfähig (Robbins, 2005). Beim Menschen hat TBG, beim Hund TTR die höchste Bindungskapazität für Schilddrüsenhormone. Plasmaproteine für T₄ haben beim Hund eine niedrigere Affinität als beim Menschen. Im Zusammenhang mit der schwächeren Bindung an die Transportproteine ist die Gesamt-T₄-Konzentration im Plasma niedriger, der Anteil des FT₄ und der Hormon-turn-over beim Hund höher als beim Menschen (Belshaw, 1983). Die gebundenen Hormone passieren nicht sofort die glomerulären Filtermembranen, sondern bilden im Blut ein Hormonreservoir, so dass die Hormonabgabe an das Gewebe gepuffert ist (Robbins, 2005). Das Verhältnis von freiem zu gebundenem Schilddrüsenhormon wird von Medikamenten und Krankheiten, die eine Wirkung auf den Gesamt-Protein-Gehalt des Blutes besitzen, stark beeinflusst (Wartofsky und Burman, 1982).

Die Bedeutung der Phylogenese verschiedener T₄-bindender Proteine liegt vermutlich zum einen in der Sicherung einer homogenen T₄-Verteilung in allen Geweben, die sich in ihrem Aufbau entwicklungsgeschichtlich zunehmend differenziert haben. Zum anderen bietet die Redundanz mehrerer Schilddrüsenhormontransportsysteme einen Selektionsvorteil, da bei Ausfall eines Systems die regelrechte T₄-Verteilung und -Speicherung auch weiterhin gewährleistet ist (Mendel et al., 1989).

Bei den **Reptilien** (11 untersuchte Spezies) ist Albumin wesentliches Transportprotein. Zusätzlich besitzen manche Schildkrötenarten (*Trachemys spp.*) ein Vitamin D-bindendes Protein, das auch Thyroxin binden kann und elektrophoretisch aufgetrennt Ähnlichkeit mit TBG aufweist (Glennemeier und Licht, 1993; Licht, 1994; Licht et al., 1991; Pavgi und Licht, 1992; Schreiber und Richardson, 1997).

Alle untersuchten **Fische** (4 Arten) und **Amphibien** (3 Arten) haben lediglich Albumin als Schilddrüsenhormontransporter (Schreiber und Richardson, 1997).

Bei **Vögeln** (5 untersuchte Spezies) konnten bislang Albumin und TTR als Transportproteine nachgewiesen werden (Schreiber und Richardson, 1997). Hühnervögel scheinen noch ein drittes Thyroxin-bindendes Protein zu besitzen, das annähernd das gleiche Molekulargewicht, ein ähnliches Verhalten in der Serumelektrophorese und eine ähnliche T₄-Bindungsaffinität wie humanes TBG zeigt und ebenso ein Glykoprotein ist (Bhat und Cama, 1978).

Australische **Beuteltiere** (68 untersuchte Spezies) besitzen allesamt Albumin als primären T₄/T₃-Transporter. Zusätzlich besitzen die *Diprotodonta* TTR (Richardson et al., 1994; Schreiber und Richardson, 1997).

Viele **Säugetiere** haben alle drei Schilddrüsenhormonbindungsproteine, aber nicht bei allen werden sie während des gesamten Lebens exprimiert. Bei Ratten wird die TBG-Synthese nach Bedarf modifiziert (Emerson et al., 1993). In ihrem Genom findet sich ein TBG-Gen, dessen Translationsprodukt eine 76%-ige Homologie zum humanen TBG zeigt (Imamura et al., 1991). Dieses TBG wird unmittelbar postpartal mit maximaler Expression am 15. Tag nach der Geburt synthetisiert, im Erwachsenenalter ist das Gen supprimiert, im Senium jedoch (ab etwa dem 300. Tag) wieder exprimiert. Dieser Mechanismus korreliert mit der funktionellen T₄-Konzentration im Serum: unmittelbar nach der Geburt ist die T₄-Produktion noch niedrig. Im Alter dagegen scheint die Wirkung der Schilddrüsenhormone nachzulassen (Savu et al., 1991). Erzeugt man bei erwachsenen Ratten experimentell eine Hypothyreose, so wird wieder TBG synthetisiert (Vranckx et al., 1990a). Möglicherweise dient dieser Vorgang einer Begrenzung der renalen Schilddrüsenhormon-Clearance in Zeiten relativen Jodid- oder T₄-Mangels. Auch eine Fledermausart (*Myotis lucifugus*) kann ihre TBG-Synthese wechselnden Verhältnissen, wie Winterschlaf und Trächtigkeit anpassen (Kwieceński et al., 1991).

2.2.6.1 Albumin

Albumin ist das wohl phylogenetisch älteste Schilddrüsenhormon-Transportprotein in Wirbeltieren (Richardson et al., 1994). Die Aufgaben von Albumin sind mannigfaltig, neben der Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Druckes ist es für die Bindung und Transport von Hormonen, Metaboliten, Metallionen, Bilirubin, freien Fettsäuren, Aminosäuren und Medikamenten verantwortlich (Robbins, 2005). Das in der Leber synthetisierte Protein hat ein

Molekulargewicht von 66kDa und eine Länge von 585 Aminosäuren. Albumin bindet Thyroxin mit einer Affinität von $5 \times 10^5 \text{Mol}^{-1}$. Außer im Blut, wo es ca. 52 bis 62% des Gesamteiweißes ausmacht, kommt Albumin auch im *Liquor cerebrospinalis*, in der Lymphe und im Muskelgewebe vor (Robbins, 2005).

2.2.6.2 Transthyretin (TTR)

Im Blut wird das Schilddrüsenhormon T_4 beim Menschen zu 11 Prozent an Transthyretin (TTR; früher Thyroxin-bindendes Präalbumin (TBPA)) gebunden und zu den Geweben transportiert (Schreiber und Richardson, 1997). Wie die Arbeitsgruppe Refetoff jedoch feststellte, transportiert es kein T_3 (Refetoff et al., 1970). TTR wurde beim Rind, Hund und Kaninchen nachgewiesen. Es weist eine strukturelle Verwandtschaft mit verschiedenen gastrointestinalen Proteohormonen auf (Döcke, 1994). Neben dem Transport von Schilddrüsenhormonen kann es auch gleichzeitig einen Komplex mit dem Retinol-bindenden Protein (RBP) bilden und dadurch dessen glomeruläre Filtration in der Niere verhindern. TTR besteht aus vier identischen Monomeren mit jeweils 127 Aminosäuren. Als Gesamtprotein hat es ein Molekulargewicht von 54 kDa. Die Bindungsaffinität für Thyroxin beträgt $3,5 \times 10^7 \text{M}^{-1}$. Die Synthese erfolgt sowohl in der Leber mit anschließender Sekretion ins Blut und gleichzeitig auch im *Plexus chorioideus* mit Sekretion in den Liquor. Obwohl TTR im Plasma nur 15% T_4 bindet, ist es das Hauptbindungsprotein für T_4 im Liquor. Im ZNS bindet TTR außerdem an spezifische TTR-Rezeptoren in den Astrozyten (Divino und Schussler, 1990).

2.2.6.3 Thyroxin-bindendes Globulin (TBG)

TBG ist ein Glykoprotein, das im Serum der meisten höheren Säugetieren als wichtigstes Transportprotein für Schilddrüsenhormone gilt.

2.2.6.3.1 Das humane TBG-Gen

Das TBG-Gen wurde auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq 22.2) lokalisiert (Mori et al., 1995; Trent et al., 1987). Angeborene TBG-Gen Defekte folgen somit einem X-chromosomal gebundenen Erbgang (Burr et al., 1980). Von der Sequenz einer menschlichen TBG-cDNA wurde die Primärstruktur abgeleitet (Flink et al., 1986) und die Organisation des Gens durch Vergleich mit genomischer DNA (gDNA) bestimmt (Refetoff et al., 1996). Es

umfasst 5 Exons (0 bis 4) und hat (die Introns und Promotorregion mit eingerechnet) eine Länge von etwa 8000 Basenpaaren (bp). Das erste Exon (0) ist eine kleine Region, die auf der gDNA mehr als 1000 bp distal des Exons 1 liegt und das 5'-nicht-translatierte Ende der mRNA codiert (Mori et al., 1988). In dieser Region existieren zwei Transkriptions-Startstellen. Am 3'-Ende hat das TBG-Gen zwei Poly-A-Signale (Kambe et al., 1988). Dadurch entstehen zwei mRNA-Spezies von 1400 und 1600 bp Länge, deren codierende Region konstant 1245 bp lang ist.

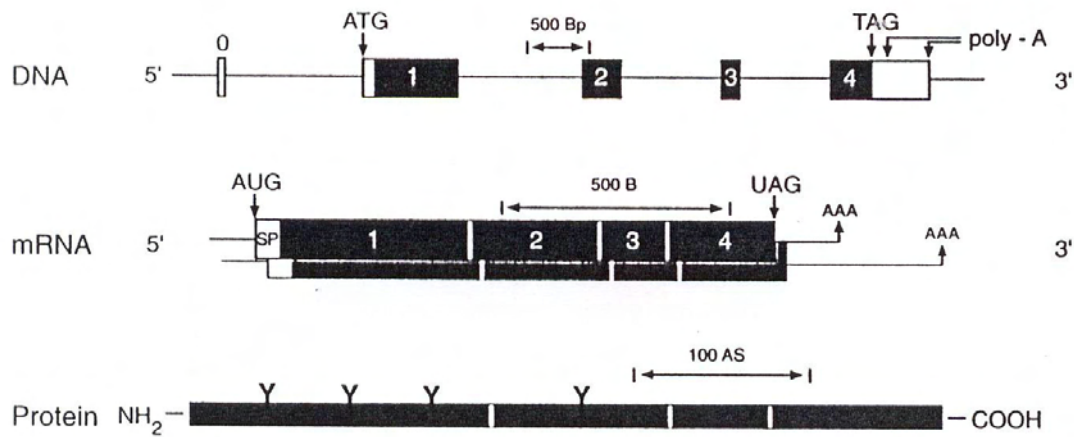


Abb. 9 Organisation des humanen TBG-Gens.

Das auf dem X-Chromosom gelegene singuläre TBG-Gen (DNA) hat 5 Exons, 0 - 4. Transkriptionsstart ist bei Exon 0, das ATG-Codon des Translationsstartes liegt auf Exon 1 (RNA: AUG). Das Translationsstop-Codon (DNA: TAG, RNA: UAG) liegt auf Exon 4. Das TBG-Gen hat zwei poly-Adenylationssignale (poly-A), so dass zwei verschiedene mRNA entstehen. Dem in schwarz dargestellten Anteilen des fertigen Proteins ist noch ein 20 Aminosäuren-langes Signalpeptid (SP) vorgelagert. Dies ermöglicht die Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat sowie Sekretion aus der Leberzelle. Die auf dem Protein verwendeten Glykosilierungsstellen sind mit Y gekennzeichnet. Bei DNA und RNA sind die 5'- und 3'-Enden markiert, beim Protein der Amino (NH₂-) und Carboxyterminus (-COOH). Die Größenmaßstäbe sind für die DNA in Basenpaaren, für die RNA in Basen und das Protein in Aminosäuren angegeben. (aus Janssen 1992).

2.2.6.3.2 Struktur des humanen TBG

Das primäre TBG-Translationsprodukt ist ein Polypeptid aus 415 Aminosäuren, von denen die ersten 20 das Signalpeptid darstellen und vom reifen Protein abgespalten werden (Flink et al., 1986). Das fertige Molekül besteht nach Passage durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat aus 395 Residuen, die ein Molekulargewicht von 44 kDa besitzen. An die ersten vier der fünf potentiellen Glykosilierungsstellen sind N-glykosidisch Kohlenhydratgruppen gebunden, die zu einem Gesamtgewicht von 54 kDa führen (Gershengorn et al., 1977). Der Kohlenhydratanteil des TBG ist für die korrekte Faltung und Sekretion des Moleküls (Murata et al., 1986a), seine Mikroheterogenität bei der Isoelektrischen Fokussierung (Gartner et al., 1981) und die Serum-Clearance durch die Leber (Ain et al., 1987) verantwortlich. Ist das Molekül fertig gestellt, d.h. korrekt gefaltet und sezerniert, beeinflusst die nachträgliche Abspaltung des Kohlenhydratanteils allerdings weder die Immunogenität noch die T₄-Bindung (Cheng et al., 1979).

In geringen Mengen befindet sich TBG in allen Körperflüssigkeiten, jedoch immer in geringeren Mengen als im Serum. Es ist unter anderem im Liquor, in Gelenk- und Amnionflüssigkeit nachweisbar. Neben der funktionellen, nativen Form (nTBG) ist zumindest beim Menschen in geringen Mengen stets auch eine denaturierte Form (dnTBG) vorhanden (nTBG:dnTBG = 250:1) (Refetoff, 1989). Diese lassen sich durch spezifische Antikörper unterscheiden (Refetoff, 1989). Viele der genetisch bedingten humanen TBG-Varianten gehen mit erhöhten Spiegeln der denaturierten Form einher (Janssen et al., 1991; Murata et al., 1986b).

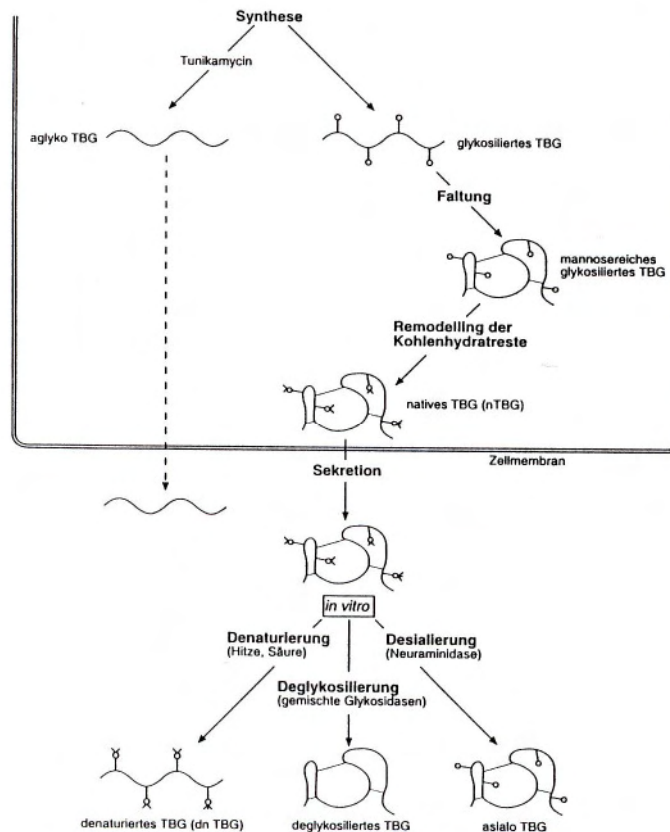


Abb. 10 Verschiedene Glykosilierungsformen des TBG.

In der Zellkultur, z.B. mit der Leberzelllinie HepG2 und durch *in vitro* Modifikation lassen sich verschiedene Glykosilierungsformen des TBG erzeugen. Tunikamycin hemmt die Glykosylierung *in vivo*, so dass aglyko TBG entsteht, das nur bei Zelltod außerhalb von Zellen nachgewiesen werden kann. Ohne intrazelluläre Manipulation entsteht über die Vorstufen der primären und mannosereichen Formen glykosiliertes TBG, das nach Remodelling der Kohlenhydrate und Faltung als natives TBG (nTBG) sezerniert wird. Dieses kann durch Hitze oder Säure denaturiert (dnTBG), durch gemischte Glykosidasen deglykosyliert (deglykosiliertes TBG) und durch Neuraminidasen desialiert (asialo TBG) werden. Das aglyko TBG und das dnTBG weisen keine T₃- oder T₄-Bindung auf, die anderen Formen verhalten sich wie natives TBG. (modifiziert nach Refetoff 1989).

2.2.6.3.3 Konzentration von TBG im menschlichen Serum

Der Referenzbereich der TBG-Konzentration im menschlichen Serum liegt zwischen 1,1 und 2,2 mg/dl, wobei die Schwangerschaft die bekannteste physiologische Ausnahme darstellt. Hier verdreifacht sich die Konzentration von TBG im mütterlichen Serum durch eine

vermehrte Sialisierung der Kohlenhydrat-Seitenketten des TBG-Moleküls (Ain et al., 1987; Ain und Refetoff, 1988; Gartner et al., 1981), die eine verminderte TBG-Clearance durch den Asialoglykoproteinrezeptor der Leber zur Folge hat und so die Halbwertszeit des TBG im Blut verlängert (Ashwell und Harford, 1982). Für die Versorgung des Feten mit mütterlichem Schilddrüsenhormon ist der Konzentrationsanstieg essentiell. Die Plazentagängigkeit von T_4 gilt in den entscheidenden ersten 20 Entwicklungswochen des Feten dabei als gesichert. In dieser kritischen Phasen der Gehirnentwicklung führt eine Schilddrüsenhormonunterversorgung des Embryo zu einer Reihe schwerster Stoffwechselstörungen, deren klinisches Korrelat als Kretinismus bekannt ist (Ekins et al., 1994).

Für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft ist TBG ebenfalls bedeutsam: in einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass bei Frauen, die eine Fehlgeburt erlitten, der TBG-Anstieg in der Frühschwangerschaft signifikant vermindert war (Skjoldebrand et al., 1986). Auch bei Tieren lässt sich der physiologische Mechanismus des TBG-Konzentrationsanstieges in der Trächtigkeit nachweisen. Zumindest bei einigen Mammaliern ist die Entwicklung schwerer Verhaltensstörungen als Pendant zum humanen Kretinismus gesichert (Ekins et al., 1994). Bei den landwirtschaftlichen Nutztieren ist eine Steigerung der TBG-Konzentration während der Trächtigkeit unbekannt. (Döcke, 1994).

Unter einer Therapie mit 5-Fluoruracil, Perphenazin, Clofibrat oder synthetischen Östrogenen sowie bei akuten Lebererkrankungen steigt die TBG-Konzentration ebenfalls aufgrund vermehrter Sialisierung und verminderter Clearance durch den Asialoglykoproteinrezeptor an (Refetoff, 1989). Dahingegen ist ein Absinken des TBG-Spiegels bei einer Synthesestörung durch chronische Leberschädigung, starkem Proteinverlust (z.B. nephrotischem Syndrom) und Therapie mit Androgenen oder Glucocorticoiden zu beobachten (Refetoff, 1989).

Die Bindungsaffinität von TBG zu T_4 kann ebenfalls beeinflusst werden. Schilddrüsenhormone werden durch freie Fettsäuren (Lim et al., 1991) und Medikamente wie Heparin (Wenzel, 1981), Diazepam, Phenytoin, Fenclofenac und Furosemid (Munro et al., 1989), Salizylate (Goussis und Theodoropoulos, 1990) und Carbamazepin (Isojarvi et al., 1989) aus ihrer Bindung verdrängt. Unbeeinflusst hingegen bleibt die Bindungsaffinität unter Therapie mit Barbituraten, welche nur an TTR und Albumin binden, was beim T_4 -Bindungstest für TBG genutzt wird.

2.2.6.3.4 TBG bei anderen Spezies

Bei den meisten der mittlerweile über hundert verschiedenen untersuchten Säugetieren wurde TBG als wichtigstes Transportprotein für Schilddrüsenhormone nachgewiesen. Allerdings fand es sich nur bei wenigen Carnivoren, während es bei den meisten Herbivoren vorhanden ist (Janssen et al., 2002; Larsson et al., 1985; Refetoff et al., 1970; Richardson et al., 1994; Seo et al., 1989). Als ursächlich wird vermutet, dass Carnivoren ihren Jod- und T₄-Bedarf über die Nahrung decken können, während die Thyroxin- und damit Jodspeicherung bei Herbivoren einen Selektionsvorteil bietet (Janssen et al., 2002).

Die bisher charakterisierten TBGs von Schaf (Tsykin und Schreiber, 1993), Ratte (Imamura et al., 1991), Schwein (Janssen et al., 2002), Rind (Janssen et al., 2002) und Pferd (Skubella, 2005) zeigen alle eine hohe Homologie zum humanen TBG-Molekül. Das **TBG beim Schaf** wird von einer cDNA von 1379 Basenpaaren translatiert. Das fertige Translationsprodukt aus 412 Aminosäuren inkl. 16 Aminosäuren für das Signalpeptid weist eine Homologie von 85% auf Nukleotidebene und eine von 82% auf AS-Ebene zum humanen TBG auf. Das Schafs-TBG wird ausschließlich in der Leber exprimiert (Tsykin und Schreiber, 1993). Das **TBG bei der Ratte** hat eine Homologie von 76% der Aminosäuresequenz und von 81% der Nukleotidsequenz der codierenden Region, während das 3' nicht translatierte Ende lediglich eine Ähnlichkeit von 30% hat. Der NH₂ Terminus des TBG der Ratte ist identisch mit menschlichem TBG. Das ausgereifte TBG der Ratte besteht aus 398 Aminosäuren. Die Ligandenbindungsstelle und vier der fünf Glykosilierungsstellen sind konserviert. Gleichzeitig zeigt das Ratten-spezifische TBG eine moderate Homologie mit zahlreichen Vertretern der Familie der Serin- Proteaseinhibitoren (Imamura et al., 1991). Das **TBG beim Schwein** wird von einer cDNA von 1263 Basenpaaren translatiert, die für 420 Aminosäuren kodiert. Zum sezernierten humanen TBG besteht eine Homologie von 85% auf Nukleotid- und 83% auf Aminosäureebene. Auch im porcinen TBG sind vier der fünf humanen Glykosilierungsstellen konserviert (Janssen et al., 2002). Das ins Blut sezernierte **TBG vom Rind** hat eine Gesamtlänge von 396 Aminosäuren. Beim bovinen TBG lassen sich zwei Signalpeptide unterscheiden, die eine Länge von 15 bzw. 23 Aminosäuren aufweisen. Die Homologie der Aminosäuresequenz zum humanen TBG beträgt 84% (Janssen et al., 2002). Das **TBG beim Pferd** hat eine Gesamtlänge von 398 Aminosäuren. Wie beim Schwein und der Ratte weist auch das equine TBG eine zusätzliche Glykosilierungsstelle im Vergleich zum humanen TBG auf. Ein Vergleich auf Nukleotidebene zeigt eine Homologie von 84% (Skubella, 2005).

2.3 Schilddrüsenfunktionsstörungen beim Hund

2.3.1 Canine Hypothyreose

Die Hypothyreose ist die häufigste Schilddrüsenerkrankung des Hundes (Ferguson, 1984). Die Ursache der Hypothyreose, d.h. eine verminderte Synthese oder Sekretion von T₃ und T₄, kann wie beim Menschen durch eine Störung auf jeder Ebene der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse bedingt sein. Die Klassifikation erfolgt nach dem Ort der Störung: Die Hypothyreose ist primär, wenn die Läsion in der Schilddrüse selbst begründet ist, sekundär wenn die Hypophyse oder tertiär wenn der Hypothalamus betroffen ist. Außerdem werden angeborene von erworbenen Hypothyreosen unterschieden.

2.3.1.1 Primäre canine Hypothyreose

Die primäre canine Hypothyreose kann angeboren oder erworben sein. Ätiologisch liegt eine Erkrankung der Schilddrüse selbst vor (Tab. 1). Der angeborenen primären Form wird eine sehr geringe Inzidenzrate zugeschrieben. Meist liegen ursächlich Defekte in der Jodaufnahme und Hormonbildungsstörungen vor. Da jedoch im Gegensatz zum Menschen beim Hund kein Screening-Test auf das Vorliegen einer kongenitalen Hypothyreose durchgeführt wird, gibt es keine verlässlichen epidemiologischen Daten. Vermutlich sterben die Welpen sehr früh (Kemppainen und Clark, 1994). Es existieren nur wenige Einzelkasuistiken (Chastain et al., 1983; Greco et al., 1985).

Tab. 1 Ursachen der Hypothyreose beim Hund.

	kongenital	erworben
Primär verringerte T ₄ /T ₃ -Produktion	Schilddrüsenagenesie, -aplasie, -dysplasie	lymphozytäre Thyreoiditis, idiopathische Atrophie
Sekundär verringerte TSH-Produktion	Panhypopituitarismus	hypophysäre Neoplasie, andere Hypophysen- schädigungen (z.B. Trauma)

In über 95% der klinischen Fälle liegt eine erworbene Form der primären Hypothyreose vor (Feldman, 1996). Ursächlich liegen hier zwei pathophysiologische Prozesse zugrunde: Zum

einen eine chronische lymphozytäre Thyreoiditis und zum anderen eine idiopathische Atrophie der Schilddrüse, die in etwa gleich häufig vorkommen (Gosselin et al., 1981; Kemppainen und Clark, 1994). Die lymphozytäre Thyreoiditis ist gekennzeichnet durch diffuse Infiltrate von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in der Schilddrüse. Sie führt zu einer fortschreitenden Zerstörung der Follikel und einer sekundären Fibrose (Gosselin et al., 1981; Mansfield und Mooney, 2006). Dieser Prozess kann sich über drei bis vier Jahre hinziehen und führt erst bei Zerstörung von mehr als 75% des Schilddrüsengewebes zur klinischen Manifestation. Bei dieser Autoimmunkrankheit werden Autoantikörper gegen das Schilddrüsengewebe, Thyreoglobulin und T₃ gebildet (Feldman, 1996; Gosselin et al., 1981; Gosselin et al., 1980; Scott-Moncrieff und Guptill-Yoran, 2005). Bezüglich der histologischen Veränderungen und der Anwesenheit von Autoantikörpern ähnelt die canine lymphozytäre Thyreoiditis der Hashimoto-Thyreoiditis des Menschen (Kemppainen und Clark, 1994). Bei der idiopathischen Atrophie der Schilddrüse ist, wie der Name schon sagt, die Ätiologie und Pathogenese nicht bekannt; sie ist durch den Untergang von Schilddrüsenparenchym und Ersatz durch Fettgewebe charakterisiert. Hierbei fehlen entzündliche Infiltrate (Gosselin et al., 1981). Da keine Anzeichen einer Entzündung vorliegen, ist es unwahrscheinlich, dass die idiopathische Atrophie einfach nur die Endform der lymphozytären Thyreoiditis darstellt (Feldman, 1996; Kemppainen und Clark, 1994). Die idiopathische Atrophie der Schilddrüse kann histologisch von den atrophischen Veränderungen bei sekundärer Hypothyreose differenziert werden, da bei letzterer die degenerativen Veränderungen an den Schilddrüsenfollikeln fehlen (Feldman, 1996).

Neben diesen beiden Formen können auch in sehr seltenen Fällen Neoplasien der Schilddrüse, besonders Karzinome, klinische Symptome einer Hypothyreose auslösen (Grubor und Haynes, 2005; Lee et al., 2006). Sie sind in der Regel hormonell inaktiv und verursachen nur im Ausnahmefall durch Verdrängung gesunden Gewebes eine Hypothyreose (Feldman, 1996). Nur etwa 2% aller caninen Tumoren sind Schilddrüsenneoplasien, wobei Adenome, die meist asymptomatisch bleiben und nicht zu palpieren sind, zufällig diagnostiziert werden. Das durchschnittliche Alter für Adenome liegt bei 10, das für Schilddrüsenneoplasien bei 9 Jahren. Schilddrüsenneoplasien sind bei Hunden unter fünf Jahren extrem selten (Loar, 1986). Hunde mit Schilddrüsenneoplasien werden weniger aufgrund von klinischen Symptomen einer Hypothyreose als vielmehr wegen Umfangsvermehrungen in der zervikalen Region auffällig, die durch Kompression der Trachea (Leav et al., 1976), aber auch des Larynx, Ösophagus, großer Blutgefäße und lymphatischen Gewebes (Loar, 1986) zu entsprechenden

Symptomen führen. Im Zuge der Neoplasie sind Metastasen in Lunge und regionale Lymphknoten häufig (Leav et al., 1976); (Loar, 1986). Methode der Wahl zur Diagnosesicherung ist die Feinnadelaspirationszytologie (Thompson et al., 1980). Im Gegensatz zum Menschen hat das Schilddrüsenkarzinom beim Hund eine schlechte Prognose (Loar, 1986).

2.3.1.2 Sekundäre canine Hypothyreose

Eine sekundäre Hypothyreose entsteht durch Atrophie der Schilddrüse infolge einer verminderten TSH-Sekretion der Adenohypophyse. Etwa 5% aller Hypothyreosen des Hundes sind sekundäre Formen (Belshaw, 1983). Während die primäre, kongenitale Hypothyreose auf einer Dysplasie der Schilddrüse, einem Jodmangel oder auf Enzymdefekten beruhen kann, ist die Ursache für eine sekundäre kongenitale Hypothyreose ein Panhypopituitarismus, z.B. durch eine Dysplasie der Rathke-Tasche. Eine isolierte TSH-Defizienz ist beim Hund nicht beschrieben (Chastain et al., 1983; Greco et al., 1991; Greco et al., 1985). Da der Defekt auch Synthese und Sekretion anderer Hypophysenhormone, insbesondere des Wachstumshormons STH betrifft, treten kongenitale hypophysäre Defekte in der Regel als Zwergwuchs in Erscheinung (Feldman, 1996). In einigen Fällen einer sekundär erworbenen Hypothyreose liegt ätiologisch eine Neoplasie der Hypophyse vor. Durch den raumfordernden Prozess sind nicht nur die thyreotropen Zellen zerstört, sondern gleichzeitig treten auch andere Endokrinopathien auf (*Diabetes insipidus centralis*, Hypo- und Hyperkortisolismus und Störungen des Reproduktionssystems (Barr, 1985; Neer und Reavis, 1983). Die häufigsten Fallbeschreibungen betreffen ACTH-sezernierende Adenome. Die sekundäre Hypothyreose entsteht hierbei nicht durch einen raumfordernden, die thyreotropen Zellen direkt zerstörenden Tumor, sondern durch die funktionelle Supprimierung aufgrund hoher Kortisolspiegel im Serum (Feldman, 1996; Ferguson und Peterson, 1992). Auch andere Grunderkrankungen, Hormone, Pharmaka und eine Malnutrition vermögen die TSH-Synthese zu supprimieren und können damit eine sekundäre Hypothyreose auslösen (Feldman, 1996).

2.3.1.3 Tertiäre Hypothyreose

Bei der tertiären Hypothyreose ist die Schilddrüse selbst nicht betroffen und somit in der Lage, eine geringe Grundsynthese von Schilddrüsenhormonen aufrecht zu erhalten, die sekundäre und tertiäre Hypothyreosen sind daher immer milder als die primären Formen. Die

Ursache der tertiären Hypothyreose ist das Fehlen von TRH, so dass die Hypophyse sekundär kein TSH ausschüttet. Diese Form der Hypothyreose ist beim Menschen sehr selten, beim Hund unbekannt (Feldman, 1996; Kraft, 2000).

2.3.2 Klinisches Bild der caninen Hypothyreose

Das klinische Bild einer Hypothyreose ist sehr heterogen, so dass es keine pathognomonischen Symptome der Hypothyreose gibt. Allgemeine klinische Symptome, ausgelöst durch einen reduzierten Metabolismus, sind Lethargie, Schläfrigkeit, Interesselosigkeit, Adipositas bei gleich bleibender Futtermittelaufnahme, Thermophilie, verminderte Ausdauer und Wesensveränderungen, eventuell auch Hypothermie (Dixon et al., 2002; Martin et al., 2006; Panciera, 1994; Peterson und Ferguson, 1989).

Haut- und Haarkleid: Gehäuft ist ein trockenes und glanzloses Haarkleid mit verstärktem Haarausfall und verzögertem Haarwuchs zu beobachten. Da Schilddrüsenhormone benötigt werden, um den Haarfollikelzyklus in die Anagenphase zu bringen, verharren die Haarfollikel in der Telogenphase und der Haarwuchs bleibt aus (Credille et al., 2001; Panciera, 2001). Häufig geht der Haarausfall mit Hyperpigmentation und Hyperkeratose der Haut einher. Die Ausdünnung des Haarkleides ist meist dorsal am Hals, am Rumpf sowie im Vulvabereich besonders ausgeprägt (Frank, 2006; Kraft, 1990). Neben schlechter Wundheilung tritt häufig eine trockene oder fettige Seborrhöe auf, die oftmals mit Juckreiz verbunden ist. Als Auslöser der Pyodermie sehen einige Autoren eine Schwächung des Immunsystems an (Feldman, 1996; Panciera, 2001). Aufgrund eines Myxödems, das sich vor allem im Kopfbereich manifestiert, zeigen einige Hunde durch Verdickung der Hautfalten über den Augen einen typischen „traurigen Blick“ (Ginn und Vilensky, 2006; Panciera, 2001).

Herz- und Kreislaufsystem: Eine Hypothyreose kann beim Hund zu einer reversiblen Funktionseinschränkung des linken Ventrikels führen (Stephan et al., 2003). Klinische Manifestationen sind in der Regel eine Bradykardie, ein schwacher Herzspitzenstoß und kardiale Arrhythmien (Kienle et al., 1994). Im EKG finden sich Veränderungen in Form von negativen T-Zacken, einer Niedervoltage des QRS-Komplexes und einer Sinusbradykardie (Belshaw, 1983). Bereits bestehende Herzerkrankungen können bei einer Hypothyreose klinisch manifest werden oder sich verschlimmern (Panciera und Refsal, 1994).

Geschlechtsapparat: Bei hypothyreoten Hündinnen werden Zyklusanomalien, Aborte und Sterilität beschrieben (Feldman, 1996; Panciera, 2001). Beim Rüden tritt häufig eine

Hodenatrophie, Oligo- bis Azoospermie und Libidomangel auf. Da die Schilddrüsenhormone essentiell für die Sekretion von FSH und LH sind, erklärt sich ein verlängertes Intervall des Interöstrus bei hypothyreoten Hündinnen.

Gastrointestinaltrakt: Unter der Hypothyreose kann es aufgrund der herabgesetzten Magen-Darm-Peristaltik und den damit verbundenen verlängerten Passagezeiten zu trockenen Fäzes und zu Obstipationen kommen (Belshaw, 1983). Bei einigen Hunden ist allerdings auch eine milde Diarrhöe beschrieben worden (Belshaw, 1983; Feldman, 1996). Bruchim et al. konnten bei einem hypothyreoten Boxer mit Dysphagie, Regurgitation und nasalem Reflux während der Wasseraufnahme mittels oraler Kontrastmittelaufnahmen eine Ösophagusachalasie nachweisen (Bruchim et al., 2005).

Neuro- und Myopathien: Neuromuskuläre Symptome kommen meist bei größeren und älteren Hunden ohne Rasse- und Geschlechtsdisposition vor und zeigen eine chronisch-progressive Verlaufsform. Hierbei müssen die klassischen Symptome einer Hypothyreose nicht auftreten (Higgins et al., 2006; Jaggy und Oliver, 1994). In einer Untersuchung von 29 hypothyreoten Hunden wurden periphere vestibuläre Defizite, Megaösophagus, Erkrankungen des unteren Motoneurons und Larynxparalyse beschrieben (Jaggy et al., 1994). Budsberg et al. (Budsberg et al., 1993) fanden bei vier Hunden mit permanenter oder intermittierender Lahmheit einer Vordergliedmaße ursächlich Hypothyreosen mit sekundären generalisierten Polyneuropathien. Das dominierende Symptom war eine generalisierte Schwäche. Die Polyneuropathie kann vestibulär, spinal, laryngeal und mit oder ohne Megaösophagus auftreten, der als Komplikation eine Aspirationspneumonie verursachen kann und dann die Prognose verschlechtert. Myopathien und Polyneuropathien sind selten, ganz selten treten Enzephalopathien auf (Jaggy und Oliver, 1994). Das Auftreten neurologischer Symptome bei Hypothyreose wird durch eine reduzierte ATP-Synthese und der daraus resultierenden Abnahme der Na/K-ATPase-Aktivität erklärt. Der axonale Transport der Nervenzelle ist von der Na/K-Pumpe abhängig, daher kommt es bei einer Hypothyreose zur axonalen Degeneration (Budsberg et al., 1993; Jaggy et al., 1994).

2.3.3 Diagnose der caninen Hypothyreose

2.3.3.1 Bestimmung von Thyroxin

Seit der Entwicklung der ersten Radioimmunoassays für Insulin nahm die Anwendung radiometrischer Verfahren für analytische Untersuchungen und Bestimmungen biologisch

wichtiger Substanzen wie Enzyme, Steroide, Hormone und Vitamine in Blut, Urin, Speichel oder anderen Körperflüssigkeiten einen enormen Aufschwung. Die Erfahrungen, die bei den radiometrischen Verfahren gesammelt wurden, kommen zunehmend anderen Tracerverfahren, wie z.B. Enzym-, Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Immunoassays zugute (Berson und Yalow, 1991).

Die Bestimmung von T_3 und T_4 ist unproblematisch, da ihre Markierung mit ^{125}J und ^{131}J als den am besten geeigneten Isotopen ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften nicht verändert. Die Bestimmung der Gesamt- und der freien Schilddrüsenhormonspiegel, letztere mittels Equilibriumsdialyse oder mit Analogverfahren, erfolgt im Prinzip wie bei menschlichem Probenmaterial. Mittlerweile stehen dafür vollautomatische Verfahren zur Verfügung (Kunkel, 1991). Die Diagnose der Hypothyreose beim Hund bereitet jedoch häufig Schwierigkeiten, da die Schilddrüsenhormonkonzentrationen stark von endogenen und exogenen Faktoren abhängig sind (Alter, Rasse, Medikamente). Auch der TRH-Stimulationstest mit Bestimmung des bei der Hypothyreose fehlenden T_4 -Anstiegs bringt keine diagnostische Sicherheit (Daminet et al., 2003; Daminet und Ferguson, 2003; Frank et al., 2005; Gulikers und Panciera, 2003).

2.3.3.2 Bestimmung des caninen TSH

Die Bestimmung des caninen TSH wird als Fortschritt in der Diagnostik der Hypothyreose des Hundes angesehen. Interessanterweise wurde der Assay eigentlich gegen das TSH des Silberfuchses entwickelt, da keine ausreichende Menge an Hundehypophysen zu beschaffen war. Bei eindeutigen Werten ist die Bestimmung des caninen TSH ($c\text{TSH} > 0,6\text{ng/dl}$, $T_4 < 1,5\mu\text{g/dl}$) dem TRH-Stimulationstest überlegen (Ruschig, 1997). Bei Werten im Graubereich ($c\text{TSH}$ zwischen $0,5$ und $1,1\text{ng/ml}$, $T_4 < 4,5\mu\text{g/dl}$ oder $\text{FT}_4 < 0,60\text{ng/dl}$) kann es sich entweder um eine primäre Hypothyreose oder um eine nichtthyreoidale Krankheit handeln: In diesen Fällen ist auch weiterhin ein TRH-Stimulationstest zur Differenzierung sinnvoll. Ferguson (Ferguson, 1996) sieht eine diagnostische Vorgehensweise in der Bestimmung von FT_4 (mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse), von TSH und von TSH nach TRH-Stimulation. Auch Nichols sieht den diagnostischen Weg in der Bestimmung von TSH in Kombination mit FT_4 mittels Gleichgewichtsdialyse (Nichols und Thompsen, 1995). Jedoch warnt er vor falsch positiven Ergebnissen, da er in seinen Studien erhöhte TSH-Werte bei euthyreoten Hunden festgestellt hat. In unklaren Fällen und bei der Entscheidung, ob eine Hypothyreose oder eine nichtthyreoidale Krankheit vorliegt, empfiehlt Nichols ein aus FT_4 , T_4 , T_3 , $c\text{TSH}$ und

Thyreoglobulin-Autoantikörper (TgAAk) bestehendes „Schilddrüsenprofil“. Als Screening empfehlen Nelson und Couto die Messung von T₄, FT₄, cTSH und TgAAk nach Ausschluss anderer Erkrankungen durch ausführlicher Anamnese, klinischer Untersuchung und Laboruntersuchungen (Nelson und Couto, 2006).

2.4 Canine Hyperthyreose

Die Hyperthyreose entsteht durch eine Überproduktion an Schilddrüsenhormonen. Sie gilt als die wichtigste endokrine Störung bei der Katze (Barber und Elliott, 1996; Broussard et al., 1995; Mooney, 2005) wird beim Hund jedoch selten gesehen (Slebozinski, 1994). Obwohl die tägliche Schilddrüsenhormonproduktion beim Hund die des Menschen um ein zwei- bis dreifaches übersteigt, werden vergleichsweise größere Mengen durch fäkale Exkretion ausgeschieden. Dementsprechend haben Hunde niedrigere Gesamthormonspiegel an T₄ und T₃ als der Mensch und benötigen zur Supplementierung wesentlich größere Schilddrüsenhormonmengen (Rosychuk, 1982). Hunde haben einen sehr effizienten enterohepatischen Exkretionsmechanismus: Schilddrüsenhormone werden über die Galle ausgeschieden, aber nur weniger als 15 % des ausgeschiedenen T₄ geht zurück in den enterohepatischen Kreislauf (Rosychuk, 1982). Die hohe Exkretionsleistung für Schilddrüsenhormone macht den Hund resistent gegenüber einer Schilddrüsenüberfunktion. Erst bei massiver Überdosierung von L-Thyroxin kann das klinische Bild einer Hyperthyreose festgestellt werden (Hansen et al., 1992). Aber auch funktionelle Tumoren sind beschrieben worden, die das klinische Bild einer Thyreotoxikose verursachen (Bezzola, 2002; Loar, 1986).

2.5 FRAGESTELLUNG

Angaben zum TBG beim Hund sind widersprüchlich. So berichtet Larsson 1985 noch von einer T4-Bindung an TBG von 60% (Larsson et al., 1985), allerdings war die T4-Bindung bei diesem Bindungsprotein im Gegensatz zu 7 anderen Spezies durch Barbituratpuffer inhibierbar, so dass es sich höchstwahrscheinlich nicht um TBG handelt (Refetoff et al., 1970; Snyder et al., 1976). Darüber hinaus konnten Larsson et al. dieses T4-Bindungsprotein im Hundeserum in einer gekreuzten Immunelektrophorese mit einem polyklonalen anti-human TBG-Antikörper im Gegensatz zu TBG von anderen Spezies nicht präzipitieren (Larsson und Pettersson, 1987; Larsson et al., 1985). Spätere Arbeiten mittels Gelelektrophorese und Isoelektrische Fokussierung konnten kein TBG beim Hund nachweisen (Refetoff et al., 1970; Richardson et al., 1994; Richardson et al., 2005). Molekularbiologische Untersuchungen zum TBG des Hundes liegen nicht vor.

Die vorliegende Arbeit hat daher folgende Zielsetzung:

- Charakterisierung der Schilddrüsenfunktion, insbesondere bezüglich des Verhältnisses der freien Schilddrüsenhormone zu den Gesamthormonanteilen in einem großen Kollektiv von Hunden und Vergleich mit der des Menschen.
- Als Erklärung für die vergleichsweise niedrigen Gesamtschilddrüsenhormonspiegel erfolgte anschließend der Nachweis des Fehlens von TBG beim Hund.
- Als Ursache des Fehlens von TBG beim Hund wurde ein Promotordefekt im TBG-Gen nachgewiesen.
- Anschließend erfolgte die Charakterisierung des caninen TBG-Gens und der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz sowie Einordnung in den Stammbaum der Säugetiere.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Trypton	Difco, Detroit Michigan, USA
Barbituratpuffer	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Roth [®] , Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll [®] 400	Serva, Heidelberg
Fluoreszenz-Farbstoffs H 33258	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum	Invitrogen [™] , Karlsruhe
Formamid	Sigma, Taufkirchen
Gentamicin	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth [®] , Karlsruhe
HPLC Wasser	Merck, Darmstadt
Ionenaustauscher Resin Amberlite-400	Sigma, Taufkirchen

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaltes T4	Sigma, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
KCl	Merck, Darmstadt
LB-Medium	Roth [®] , Karlsruhe
L-Glucose	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Sigma, Taufkirchen
L-Lysin	ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio, USA
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Sigma, Taufkirchen
Ortho-Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt
Passive Lysis Buffer	Promega, Mannheim
PBS-Puffer	Invitrogen™, Karlsruhe
Penicillin	Sigma, Taufkirchen
Pepton	Sigma, Taufkirchen
Pyruvat	Sigma, Taufkirchen
Streptomycin	Sigma, Taufkirchen
Tris Ultra Qualität	Roth [®] , Karlsruhe
TransFast™ Transfektionsreagenz	Promega, Mannheim
Trypsin/EDTA	Sigma, Taufkirchen
X-gal	Invitrogen™, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth [®] , Karlsruhe

3.1.2 Enzyme

Taq Polymerase	Promega, Mannheim
Expand™High Fidelity DNA Polymerase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Hind III	NEW ENGLAND BioLabs®Inc., Frankfurt a.M.
Pst I	NEW ENGLAND BioLabs®Inc., Frankfurt a.M.
BamH I	NEW ENGLAND BioLabs®Inc., Frankfurt a.M.
Bgl II	NEW ENGLAND BioLabs®Inc., Frankfurt a.M.
Xho I	NEW ENGLAND BioLabs®Inc., Frankfurt a.M.

3.1.3 *E. coli*-Laborstamm und Liste der verwendeten Plasmidvektoren

K12-Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
DH5α	F-φ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K -m _K +) <i>phoA</i> supE44 <i>thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>	Invitrogen™, Karlsruhe

Plasmid	
pCAT	Promega, Mannheim
pBluescript	Promega, Mannheim
pGL4	Promega, Mannheim

3.1.4 Überblick über Sequenzen und Spezifitäten sämtlicher in der Arbeit verwendeter Oligonukleotid-Primer

Primer	Primersequenz (5´-3´)	
Verwendung:	Sequenzierung des Hunde-TBG-Gens inkl. Promotor	
A (-151 bis -132)	CCC TGA TGA GCA CAT CAT CA	Operon
B (750 bis 731)	CAG TGG AGC AGA TCA CTG TG	Operon
C (1617 bis -1636)	CTT GTT GGT ACT GAT ACC GG	Operon
D (2083 bis 2064)	CTT GGC ATA TTC TAG TGA TC	Operon
E (2626 bis 2645)	AAG CTT GAT ATG GTG ATTGC	Operon
F (3089 bis 3071)	TCA GAA CTG CAT CTC ACC A	Operon
G (3180 bis 3199)	CGC CAG AGA ATG ATT GAC TA	Operon
H (3599 bis 3580)	CCA TTG CAA TAC ACA CGT GC	Operon
Verwendung:	<i>in-vitro</i> -Mutagenese	
TBGP-Maus-F	GTT AAT GCT GGG GTT AAT TTG TAA CTA AGA GT	Operon
TBGP-Hund-F	GTT AAT GCT GGG GTT AAT GAG TAA CTA AGA GT	Operon
TBGP-MUT-R	ATT AAC CCC AGC ATT AAC CCT GGG ATG GTA	Operon
Verwendung:	Sequenzierung des Vektors pGL4 zur Kontrolle der Mutagenese	
SP pGL4	GAC GAT AGT CAT GCC CCG CG	Operon
SP pGL4	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC	Operon

Die Oligos wurden bei Operon Biotechnologies GmbH, Köln, hergestellt.

3.1.5 DNA Marker

Lambda Hind III Marker	Roth [®] , Karlsruhe
phiX Hae III Marker	Roth [®] , Karlsruhe

3.1.6 Kits

ExoSapIt Kit	USB, Cleveland OH, USA
QIAquick Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden
GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System	Invitrogen™, Karlsruhe
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Boehringer, Mannheim

3.1.7 Eukaryotische Zelllinie

Zelllinie	Herkunft
HepG2	American Type Culture Collection, USA, zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. S. Refetoff, University of Chicago, USA

3.1.8 Nährmedien

- LB-Medium (Luria Broth)	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
		pH 7,0±0,2
		autoklaviert bei 121 °C, 15 min

- LB-Agar (Luria Bertani)	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
	1 N NaOH	1,00 ml
	Agar	15,00 g/l
		pH 7,0±0,2
	autoklaviert bei 121 °C, 15 min	

- Peptonwasser	Pepton	10,00 g/l
	NaCl	5,00 g/l
	Na ₂ HPO ₄	3,50 g/l
	KH ₂ PO ₄	1,50 g/l
		pH 7,2±0,2
	autoklaviert bei 121 °C, 15 min	

- SOC-Medium	Trypton	20,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
	NaCl	0,50 g/l
	250 mM KCl	10,00 ml
	5 N NaOH	0,20 ml
		pH 7,0
	autoklaviert bei 121 °C, 15 min	
	abkühlen auf 60 °C	

anschließend Zugabe von autoklaviertem 2 M/l MgCl₂ (5,00 ml) und steril filtrierter 1 M/l Glucose (20,00 ml)

- D-MEM¹	+ L-Glucose	4500 mg/l	
	+ L-Glutamin	4 mM/l	
	+ Pyruvat	110 mg/l	
	Medienzusatz	Gentamicin 40 Hexal [®]	56 µg/ml
		Fötale Kälberserum (FCS) ²	10%(v/v)

¹ Invitrogen[™], Life Technologies

² GIBCO BRL[®], Life Technologies

3.1.9 Lösungen

3.1.9.1 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese (DNA)

- TBE-Puffer Stamm-Lösung (10 x konz.)	Tris	890 mM/l	107,82 g
	Borsäure	890 mM/l	55,03 g
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM/l	18,62 g
	eingestellt mit NaOH		auf 100 ml
			davon 40 ml auf 1000 ml A. bidest.
- Stop-Lösung	Formamid		9,50 ml
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM/l	0,40 ml
	Bromphenolblau		5,00 mg
	Xylencyanol FF		5,00 mg
	A. bidest.		0,100 ml
- Agarose	Agarose		0,70 g auf 100 ml 1 x TBE
- Ethidiumbromidlösung 1%			

3.1.9.2 Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- 10 x PCR buffer ¹	Tris-HCl, pH 8,4	200 mM/l
	KCl	500 mM/l
- Taq DNA Polymerase ¹		5 U/μl
- Magnesiumchlorid-Lösung ¹		50 mM/l
- dNTP ²	PCR Nucleotide Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je dNTP 10 mM/l

¹ GIBCO BRL®, Life Technologies

² Promega Corporation

3.1.9.3 Lösungen für den T₄-Bindungstest

<p>- Barbiturat Puffer (BP) (300 mM)</p> <p>Der Ansatz wurde zum besseren Lösen kurze Zeit auf 60 °C erhitzt.</p>	<p>Barbiturat Puffer (5 x 1 Amp. jeweils zum Herstellen einer Lösung à 60 mM/l)</p>	<p>auf 1000 ml A. bidest.</p>
<p>- Bovines Serumalbumin (BSA)</p> <p>Die Konzentration betrug 20 mg/ml</p>	<p>BSA</p>	<p>100 mg</p> <p>auf 5 ml A. bidest.</p>
<p>- TB-Lösung</p>	<p>Tris/HCl, pH 8,8</p> <p>BSA</p>	<p>50 ml</p> <p>50 µl</p>
<p>- Lösung C (1 ml soll 100.000 cpm haben)</p>	<p>Barbiturat Puffer</p> <p>BSA (20 mg/ml)</p> <p>¹²⁵JT₄ , spezifische Aktivität 1080-1320µCi (40-48 MBq)/µg (Perkin Elmer, Waltham, USA)</p>	<p>10 ml</p> <p>10 µl</p> <p>10 - 25 µl</p>
<p>- Lösung D (frisch angesetzt)</p>	<p>Barbiturat Puffer</p> <p>T₄-Stock (2 mg/ml) in alkalischem H₂O:Äthanol 1:1 mit 5 Tropfen 5 M NaOH auf 10 ml)</p>	<p>3 ml</p> <p>30 µl</p>

3.1.9.4 Lösungen für die Ligation

<p>- 5 x T4 DNA Ligase Buffer GIBCO BRL[®], Life Technologies</p>	<p>Tris-HCl, pH 7,6</p> <p>MgCl₂</p> <p>ATP</p> <p>DTT</p> <p>Polyethylenglycol-8000</p>	<p>250 mM/l</p> <p>50 mM/l</p> <p>5 mM/l</p> <p>5 mM/l</p> <p>25 % (w/v)</p>
<p>- T4 DNA Ligase Invitrogen[®] Life Technologies</p>		<p>1 U/µl</p>

3.1.9.5 Lösungen für die Restriktion von DNA

- NEBuffer 2	Tris-HCl	10 mM/l
	NaCl	50 mM/l
	MgCl ₂	10 mM/l
	Dithiothreitol	1 mM/l

3.2 Geräte

Brutschrank (Hera Cell Hereus)	UTB Binder, Dortmund
Cryo-Röhrchen (Cryovial®)	Roth®, Karlsruhe
Digitalkamera CN-08	LTF-Labortechnik, Hamburg
DYNA Quant 2000 Fluorometer, Hoefer	Vertrieb: Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Gammacounter Wizard Typ 1470	Wallac, München / Helsinki
Gelkammersystem und Netzgerät	
Modell 1000/500 (Consort, E844B)	BioRad, München
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator Ultra-Turrax	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler Gradient PCR-Gerät	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen
Mikrozentrifuge (Picofuge)	Stratagene, USA
Photometer Smart Spec 3000	BioRad, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Röntgenentwickler Hyperprocessor	Amersham pharmacia, Frankfurt a. Main
Schüttelinkubator	Sanyo Gallenkamp, Bad Nenndorf
6-Loch-Platte	Greiner, Frickenhausen
Schüttler (Vortex-Evaporateur)	Buchler, USA
Sterilwerkbank LAFA-NL	Bio-Flow Technik, Meckenheim
Sirius Luminometer	Berthold Detection System, Pforzheim
Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Thermodrucker (Video Graphic Printer	
UP890 CE)	Herolab, Wiesloch
UV-Tisch	Bachofer, Reutlingen
UV-Transilluminator (E.A.S.Y.429K)	Herolab, Wiesloch

Varifuge 3.OR	Heraeus Sepatech, Hanau
4-ml und 10-ml Röhren	Sarstedt, Nümbrecht
Vortex-Schüttler Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage (KB 400-2)	Kern&Sohn GmbH, Albstadt
Wasserbad RM 20	Lauda, Königshofen

3.3 Methoden

3.3.1 Hormonbestimmungen

Für die Untersuchung der humanen Seren wurden die automatischen Chemilumineszenz Immunoassays für die Messung von TSH, FT₄ und T₄ benutzt (ADVIA Centaur, Bayer Vital, Fernwald). Diese Bestimmungen erfolgten durch die Mitarbeiter/innen im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen. Folgende Assays wurden für die Untersuchung der Hundeseren benutzt: FT₄ (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel); T₄ (Ortho-Clinical Diagnostics, Neckargemünd) und das cTSH (IMMULITE 2000, DPC Biermann, Bad Nauheim). Diese Bestimmungen erfolgten durch die Mitarbeiter/innen im Labor der Biofocus GmbH.

3.3.2 Molekularbiologische Methoden

3.3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut

Das Hunde-Vollblut wurde durch Punktion der *Vena cephalica* gewonnen. Die DNA-Extraktion des Vollblutes erfolgte mit dem QIAamp blood-Kit. Nach den Angaben des Herstellers dient das Kit zur Gewinnung von genomischer DNA aus Blut, Serum, Plasma, der Leukozytenfraktion, Körperflüssigkeiten und Zellkulturen. Die so gewonnene DNA soll frei sein von Proteinen und anderen Störfaktoren und kann direkt in der PCR eingesetzt werden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.3.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde fluorometrisch bestimmt (DYNA Quant 2000 Fluorometer, Hofer). Die Bindung des Fluoreszenz-Farbstoffs H 33258 in die kleine Furche der DNA bewirkt eine Veränderung des Emissionsspektrums des Farbstoffs von 365 nm zu 458 nm. Der Wert des gemessenen emittierten Lichtes korreliert mit der DNA-Menge und ist damit ein

direkter Indikator für die DNA-Konzentration. Das Gerät wurde vor jeder Nutzung mit einer Standard-DNA (100 ng/μl) und einem Nullwert kalibriert.

3.3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein bestimmter DNA-Bereich *in vitro* enzymatisch mittels zweier Oligonukleotid-Primer sowie der Taq-DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987). Neben der Amplifikation von DNA-Fragmenten dient die Methode z.B. der Einführung von Restriktionsenzymststellen oder anderen Modifikationen, z.B. Mutationen in der DNA. Zur Vervielfältigung gewünschter DNA-Fragmente benötigt man neben spezifischen Oligonukleotiden (Primer), welche homolog zu Sequenzen der Matrizen-DNA sind und diese am 5´ und 3´-Ende flankieren, die hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase). Diese Polymerase ermöglicht die vielfache Wiederholung der drei Teilschritte der PCR-Reaktion: Denaturierung, Primeranlagerung und Primerverlängerung. In dieser Arbeit wurde neben der Taq-Polymerase auch die Expand™ High Fidelity DNA Polymerase (Roche Molecular Biochemicals) verwendet, welche eine 3´-5´-Exonuklease-Aktivität aufweist, die eine Korrekturaktivität („proofreading“) erlaubt. Zur Ermittlung und Identifizierung der Fragmentgröße wurde anschließend eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Für die hier beschriebene Arbeit wurden mit Hilfe der PCR die DNA-Abschnitte des Hundegenoms vervielfältigt, die das TBG-Gen beinhalten. Diese Abschnitte wurden dann mit der unten beschriebenen Methode sequenziert. Die verwendeten Primer sind unter 3.1.4 angegeben. Ihre Sequenz wurde nach einer BLAST-Suche mit der menschlichen TBG gDNA Sequenz nach homologen Sequenzen im öffentlich zugänglichen Hunde Genom Projekt (Dog Genome Project: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/dog/>, http://www.fhcrc.org/science/dog_genome/ und <http://mendel.berkeley.edu/dog.html>) festgelegt. Insgesamt wurden 18 Sequenzen identifiziert, die alle auf dem X-Chromosom liegen, so dass das Hunde TBG-Gen offensichtlich ebenso wie das menschliche TBG-Gen auf dem X-Chromosom liegt. Gleichzeitig bedeutete dies eine Minimierung des Risikos der Kontamination durch Sequenzen von anderen Genen. Mit diesen Teilsequenzen und im Vergleich mit dem menschlichen TBG-Gen wurden Primer zur PCR-Amplifikation genomischer DNA vom Hund und zur anschließenden Sequenzierung erstellt.

Außerdem wurde mit der PCR und nachfolgender Sequenzierung die erfolgreiche *in vitro*-Mutagenese der menschlichen TBG-Promotor-Sequenz im *Firefly*-Luciferase-Reportervektor pGL4 kontrolliert.

3.3.2.4 Aufreinigung der PCR Produkte

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Boehringer Mannheim). Das Prinzip dieser Reinigungsmethode ist es, zu dem Lysat einen Bindepuffer mit einem chaotropen Salz (bei diesem Kit Guanidin-Thiocyanat, 3 M/l) zuzugeben. Chaotrope Salze gehen starke Interaktionen mit Wassermolekülen ein und führen zu einem Zusammenbruch des Netzwerkes von Wasserstoffbrücken. Die verminderte Wechselwirkung der Wassermoleküle mit den gelösten Nukleinsäuren fördert deren Adsorption an eine positiv geladene Glasfasermatrix, die Bestandteil der Filtrationsgefäße ist. Nach der Bindung erfolgen Waschvorgänge mit ethanolhaltigem Puffer und schließlich die Elution der PCR-Produkte mit Hilfe von TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). Die Durchführung der Reinigungsschritte erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

3.3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA auf Agarose-Gelen

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe auftrennen. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert die DNA im elektrischen Feld zum positiven Pol (Anode), wobei ihre Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Fragmentlänge ist. Aus diesem Grund wandern kleinere Fragmente schneller als größere. Des Weiteren hängt die Wanderung der DNA-Fragmente von der Stromstärke, den Pufferbedingungen, der Agarosekonzentration und der spezifischen Konformation der DNA ab. Für die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA wurden Gelträger und -kämme von Hybaid verwendet und die zu trennende Probe mit 0,3 Volumenanteilen einer Farbstoff-Schwerelösung (0,07% [w/v] Bromphenolblau, 33% [v/v] Glycerin, 7% [w/v] SDS) vermischt:

- 0,6 bis 1,5% [w/v] Agarose wurden in Elektrophoresepuffer (TBE-Puffer: 80 mM Tris, 8 mM EDTA, pH 7,6 mit 85% [w/v] Phosphorsäure eingestellt) aufgekocht und anschließend auf 63°C temperiert.

Pro 100 ml Agarose erfolgte der Zusatz von 5 µl 1 prozentigem Ethidiumbromid (10 mg/ml). Nach dem Gießen des Gels musste dies mindestens 30 min bei Raumtemperatur aushärten.

- Pro Geltasche wurden 10 - 30 µl Probe pipettiert.

- Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer (80 mM/l Tris, 8 mM/l EDTA, pH 7,6 mit 85% [w/v] Phosphorsäure eingestellt) bei einer Spannung von 5 V/cm.

Nach dem Elektrophoreselauf wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator (E.A.S.Y.429K, Herolab) bei 254 nm visualisiert. Die Dokumentation erfolgt entweder mittels einer CCD-Kamera über einen angeschlossenen Thermodrucker (Video Graphic Printer UP 890 CE, Herolab) oder mit einer Polaroidkamera unter Verwendung eines Orange-Filters (Polaroid MP4⁺ Instant Camera System, Polaroid)

3.3.2.6 Sequenzierung

Mit der nachfolgend beschriebenen DNA-Sequenzierung der mittels PCR vervielfältigten DNA-Abschnitte wurde die Nukleotidsequenz des Hunde-TBG-Gens dargestellt. Zusätzlich wurde die Sequenzierung eingesetzt, um den Erfolg der weiter unten beschriebenen *in vitro*-Mutagenese des TBG-Promotors im *Firefly*-Luciferase-Reportervektor pGL4 zu überprüfen. Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach der Methode der Didesoxy-Kettenabbruchreaktion nach Sanger (Sanger et al., 1992). Sie wurde von der Firma SRD in Oberursel auf dem DNA-Sequenziergerät ABI PRISM 377 der Firma Applied Biosystems in Foster City, Ca, USA durchgeführt. Bedingt durch den Einsatz von Didesoxynukleotiden wird die DNA-Synthese basenspezifisch terminiert, wodurch unterschiedlich lange Fragmente generiert werden. Ein Didesoxynukleotid (ddNTP) führt zum Abbruch der Strangsynthese, da ddNTPs keine freie 3'-Hydroxylgruppe besitzen, die für die Bildung der nachfolgenden Phosphodiesterbindung erforderlich ist. Es werden für diese Reaktion sowohl Didesoxy- als auch Desoxynukleotide angeboten, so dass statistisch der Kettenabbruch an jedem Nukleotid erfolgen kann. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, durch den die Base, an der der Abbruch erfolgte, identifizierbar wird. Die Sequenzierung erfolgte durch Primerwalking (Cosmide) oder unter Verwendung von Universalprimern (TOPO-Vektor).

3.3.2.7 T₄-Bindungstest

Dieser Assay wird benutzt, um die Bindungskapazität von TBG für T₄ zu bestimmen. Der T₄-Bindungstest wurde in der vorliegenden Doktorarbeit eingesetzt, um das Fehlen des TBG im Hundeserum im Vergleich zu anderen Spezies nachzuweisen. Die verschiedenen Tierseren stammten aus dem Duisburger Zoo, Münchner Tierpark Hellabrunn, Deutschen Primatenzentrum, Tierpark Bochum und dem Einsenderlabor Biofocus. Das Prinzip des Testes ist die Sättigung des TBG in der zu untersuchenden Serumprobe mit radioaktiv markierten T₄; der Überschuss an freiem T₄ wird vollständig an ein Ionenaustauscher-Harz gebunden. Durch die Verwendung von Barbiturat-Puffer, der T₄ aus der Bindung an Albumin und Transthyretin verdrängt, lässt sich das spezifisch an TBG gebundene T₄ bestimmen, so dass umgekehrt spezifisch die TBG-Menge bestimmt werden kann. Die unspezifische Bindung von T₄ und TBG an den Reaktionsgefäßwänden wird durch die Verwendung von bovinem Serumalbumin (BSA) reduziert.

Der Überstand enthält nur noch das vom TBG gebundene T₄, dessen Menge mit dem γ -Counter bestimmt wird. Störfaktoren, die im Serum vorkommen können, werden mit Hilfe der sog. Displacement-Bestimmung weitgehend eliminiert: durch Zugabe von unmarkiertem T₄ im Überschuss wird das markierte T₄ vom TBG verdrängt und an das Harz gebunden. Im Überstand verbleibt nur noch eine unspezifische markierte T₄-Menge (Displacement = Non-specific binding (NSB)). Dieser Wert wird am Ende von den einzelnen Messwerten subtrahiert.

Weiterhin werden für jeden Bindungsassay ein Null- und ein Totalwert ermittelt. Der Nullwert ergibt sich aus der Bestimmung der Radioaktivität einer Probe, die nur Lösung C ohne Zugabe von Serum enthält, diese Aktivität entspricht im Wesentlichen Verunreinigungen und Abbauprodukten des ¹²⁵I-T₄-Tracers, vor allem freies ¹²⁵Jod. Im Idealfall unterscheiden sich Displacement und Nullwert nicht sehr (um 1000 cpm, 1% der eingesetzten Radioaktivität). Der Totalwert ergibt sich durch Messung einer Probe die ebenfalls nur Lösung C enthält, aber nicht mit Harz versetzt wird, also ohne Entfernung des freien T₄.

Je 2 - 20 μ l Serum wurden mit 2 ml Lösung C gemischt. Aufteilung des Ansatzes: jeweils 950 μ l wurden zu 50 μ l TB-Lösung bzw. zu 50 μ l Lösung D (Displacement) pipettiert. Zur Bestimmung der Null- und Totalwerte wurden je Test zwei Röhrchen mit je 950 μ l Lösung C versetzt.

Nach kurzem Vortexen erfolgten eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine anschließende 30-minütige auf Eis. Die Ansätze der Probe, Displacement und des Nullwertes wurden mit 0,5 cm³ Ionenaustauscher-Harz versehen, zwei Minuten geschüttelt, mit 2 ml eiskaltem H₂O suspendiert und schließlich 30 sec gevortext. Nach Sedimentation des Harzes wurde je 1 ml des Überstandes zügig abpipettiert und die Radioaktivität im γ -Counter bestimmt.

3.3.2.8 Klonierung des hTBG-Promotors von pCAT in pBluescript

Um den Einfluss der HNF-1-Bindungsstelle auf die Transkriptionsaktivität des TBG-Promotors experimentell überprüfen zu können, sollte der TBG-Promotor vor ein Reporter-gen kloniert werden. Ziel war es, den humanen TBG-Promotor vor das *Firefly*-Luciferase-Gen zu klonieren, um dann über die Luciferaseaktivität die Promotoraktivität zu bestimmen. Anschließend sollte durch *in vitro*-Mutagenese die HNF-1-Bindungsstelle zur caninen Sequenz verändert und eine mögliche Änderung der Transkriptionsaktivität gemessen werden. Der minimale humane TBG-Promotor inklusive der HNF-1-Bindungsstelle lag bereits in einem Chloramphenicol-Acetyltransferase-Reportervektor (pCAT) vor (D5-218 pCAT), wie auch ein entsprechender Vektor mit einer die Funktion vollständig aufhebenden Sequenzveränderung der HNF-1-Bindungsstelle als Negativkontrolle (Δ D5-218). Die Plasmide pCAT mit den Inserts D5-218 und Δ D5-218 wurden freundlicherweise von Professor Dr. Sam Refetoff, University of Chicago, USA zur Verfügung gestellt. Die Umklonierung vom Chloramphenicol-Acetyltransferase-Reportervektor in einen *Firefly*-Luciferasevektor wurde durchgeführt, um durch gleichzeitige Transfektion eines zweiten, Kontrollvektors und Messung einer *Renilla*-Luciferase eine Korrektur für die Transfektionseffizienz vornehmen zu können. Da die in den pCAT und pGL4 vorhandenen Restriktionsenzym-schnittstellen keinen direkten Transfer des Promotorabschnitts D5-218 erlaubten, musste ein Umweg über den Shuttle-Vektor pBluescript gegangen werden (siehe Abbildung 20, Seite 66).

3.3.2.8.1 Restriktionsenzym-Verdau

Mit einem Restriktionsenzymverdau wurden die D5-218- und Δ D5-218-Fragmente aus den pCAT-Vektoren ausgeschnitten. Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen lässt sich DNA an spezifischen Basensequenzen schneiden. Die Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte je nach Zweck in 10 bis 120 μ l Gesamtvolumen unter den von der

Bezugsfirma angegebenen Bedingungen. Zur Restriktion von 1 µg Plasmid-DNA wurde 1 U des entsprechenden Enzyms (*HindIII*, *PstI*) eingesetzt. Mittels einer Agarosegelelektrophorese wurde festgestellt, ob die Restriktion erfolgreich durchgeführt wurde, indem das ebenfalls aufgetragene unverdaute Plasmid bzw. PCR-Produkt als Kontrolle diente.

Der auf Eis pipettiert Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

15 µl	Vector
1,5 µl	<i>HindIII</i>
1,5 µl	<i>PstI</i>
5 µl	NEB2
0,5 µl	BSA
ad 26,5 µl	A. bidest

Der Ansatz wurde 90 Minuten bei 37°C inkubiert, direkt anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung.

3.3.2.8.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von pBluescript und insert

DNA-Fragmente von 100 bp bis 50 kb wurden in 1,5%-igen Agarosegelen unter Verwendung von 0,5 x TBE (4,5 mM Tris, 4,5 mM Borsäure, 1,0 mM/l EDTA, pH 8,0) aufgetrennt.

1,5 g Agarose wurde durch Aufkochen in 100 ml 1 x TBE gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 55°C und Zugabe von 5 µl einer Ethidiumbromidlösung (1%-ig) zum Zwecke der Sichtbarmachung der DNA-Banden auf einem UV-Tisch wurde die flüssige Agarose in eine Gelkammer gegossen, in der sich ein Probenaschenkamm mit 12 bis 24 Taschen befand. Nach dem Erhärten wurde das Gel in die entsprechende, mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Nachdem die mit 1/6 Volumen Probenpuffer (0,25% [w/v] Bromphenolblau, 0,25% [w/v] Xylencyanol [v/v] Ficoll 400) versetzte DNA sowie in Abhängigkeit der polymerisierten DNA-Fragmentgröße der 1 kb DNA Ladder bzw. 100 bp DNA Ladder (Life TechnologiesTM, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) in die einzelnen Probenaschen pipettiert worden sind, wurde ein elektrisches Feld von 90 V für 90 min an die Elektrophoresekammer angelegt. Anschließend wurden die DNA-Banden mit Hilfe eines Transilluminators visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mittels einer CCD-Kamera.

3.3.2.8.3 Fragmentelution aus Agarosegelen

Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) können DNA-Fragmente, die kleiner als 10 kb sind, sehr schnell und einfach eluiert werden. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das

das entsprechende DNA-Fragment enthaltende Gelstück auf dem UV-Tisch ausgeschnitten und gewogen. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach der Hersteller-Vorschrift. Die Menge der eingesetzten Reagenzien richtete sich nach dem Gewicht des ausgeschnittenen Gelstücks. Das Verfahren beruht auf dem Auflösen der Agarose durch den mitgelieferten QX1-Puffer und einer nachfolgenden Abtrennung durch den ebenfalls zum Kit gehörenden Puffer PE über eine Säule, in der die DNA haften bleibt und anschließend mit Puffer EB (10mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert werden kann. Die Aufnahme der DNA erfolgte routinemäßig in 30 µl Puffer EB.

3.3.2.8.4 Ligation

Die mit dem Restriktionsenzym aus dem Vektor ausgeschnittenen und nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel extrahierten Fragmente müssen nun in den Zielvektor eingefügt, d.h. ligiert werden. So wurde der humane TBG-Promotor (D5-218) und der Promotor mit der veränderten HNF-1-Bindungsstellensequenz (Δ D5-218) erst aus dem Vektor pCAT ausgeschnitten und in pBluescript ligiert, um dann mit anderen Enzymen aus pBluescript ausgeschnitten und in den Firefly-Reportervektor pGL4 ligiert zu werden.

Bei einer Ligation werden DNA-Fragmente in natürlicher 5'-3'-Richtung kovalent miteinander verknüpft. Diese Reaktion wird von der T₄-DNA-Ligase katalysiert, die unter Verbrauch von ATP eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphatende und dem 3'-Hydroxyende doppelsträngiger DNA ausbildet. Eine Ligation kann mit glatten („blunt ends“) oder überhängenden („sticky ends“) DNA-Fragmentenden erfolgen.

Ligationsreaktionen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt: Ligationen von Insert-DNA in einen linearisierten Vektor wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Zusatz von 1 µl T₄-DNA-Ligase sowie 2 µl 10 x Ligase-Puffer durchgeführt. Mit A. bidest. wurde auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Es wurde zuvor restringierte und mittels „Agarose Gel DNA Extraction Kit“ aufgereinigte Plasmid-DNA verwendet. Ligationsansätze, bei denen DNA-Fragmente mit überhängenden komplementären Enden („sticky ends“) verbunden wurden, enthielten das Insert in dreifach molarem Überschuss zur Vektormenge und wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (Sambrook et al. 1996, Brüll). Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert oder direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien eingesetzt.

3.3.2.8.5 Transformation in den *E.coli*-Stamm DH5 α

Für die Übertragung von Erbmateriale in Form von freier DNA wurden die *E. coli*-Stämme TOP 10 und XL1 Blue-MR als Rezipienten verwendet. Vor dem Plasmidtransfer war es notwendig, die Zellen in einen für die Transformation kompetenten Zustand zu bringen, da *E. coli* im Gegensatz zu z.B. *Bacillus subtilis* nicht transformierbar ist.

- Für die Gewinnung kompetenter Bakterienzellen mussten zunächst 4 ml der jeweiligen LB-Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium (20% (w/v) LB-Broth Base (Gibco BRL) überimpft und für 3-4 h bei 37°C bis zu einer Zelldichte (OD₆₀₀) von 0,6 kultiviert werden.
- Die Zellen konnten anschließend durch Zentrifugation (936 x g, 4°C, 5 min) in 50 ml Reaktionsgefäßen pelletiert, dann in 25 ml eiskaltem Aqua bidest resuspendiert und erneut abzentrifugiert werden.
- Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zwei weitere Male mit 25 ml eiskaltem Aqua bidest. gewaschen.
- Danach wurden die Pellets in insgesamt 400 μ l eiskaltem Aqua bidest. aufgenommen. Nach Zugabe von 20 μ l 10%igem [v/v] Glycerin erfolgte die Portionierung zu je 40 bzw. 80 μ l in Reaktionsgefäße. Die Aliquots wurden bei -70°C eingefroren und konnten so für mehrere Monate aufbewahrt werden.

Transformation von Bakterien:

Für die Transformation wurden zu jedem 1,5 ml Reaktionsgefäß, das 50 μ l kompetente Zellen enthielt, 5 μ l Ligationsansatz gegeben, gut durchmischt und 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Zellen-DNA-Mix genau 48 sec bei 42°C inkubiert, erneut 2 Minuten auf Eis gestellt, 400 μ l steriles SOC-Medium (2% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,05% (w/v) Hefeextrakt, 0,05% (w/v) NaCl, 20 mM Glucose) dazugegeben und durchmischt. Bei der Transformation temperatursensitiver Plasmide erfolgte anschließend die Inkubation dieser Zellsuspensionen 60-90 min bei 37°C im Thermomixer. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden einerseits 100 μ l der Zellsuspensionen auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Weiterhin wurden weitere 340 μ l der Zellsuspension zentrifugiert, 240 μ l des Überstandes verworfen, die restlichen 100 μ l resuspendiert in einem zweiten Ansatz ausplattiert und ebenfalls bei 37°C bebrütet.

Jeweils 0,1 ml der transformierten Zellen wurden auf LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum (1,5% Agar in LB-Medium, 100 μ g/ml Ampicillin oder/und 25 μ g/ml Kanamycin) und 50 μ l X-gal (20 mg/ml) ausgestrichen.

3.3.2.8.6 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Das neu aus der Ligation des Zielvektors mit dem Fragment entstandene Plasmid muss in einer zur Weiterverarbeitung ausreichenden Menge vorliegen. Dazu wurden Bakterienkulturen, die dieses Plasmid tragen, hochgezogen. Hierzu wurden nach der Inkubation mindestens 3 Klone gepickt und damit jeweils eine 4 ml Übernachtskultur inokuliert (LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin). Nach 16 h Inkubation (37°C, 250 rpm) wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Plasmide nach Anleitung des Herstellers mit Hilfe von Qiaprep Spin Mini, Qiagen, Hilden, isoliert.

Das Pellet wurde mit kaltem Puffer P1 versetzt und zum Lösen gevortext. 250 µl Puffer P2 wurden hinzupipettiert und die Zellslösung für 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 U/min in der Eppendorftischzentrifuge zur Abtrennung der chromosomalen DNA und der Proteine. Der klare Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in QiaPrep-Minisäulen pipettiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 13.000 U/min wurde der Durchfluss verworfen und die Säulenmembran mit 750µl Puffer PE gespült. Der Durchfluss konnte erneut verworfen werden. Zum Trocknen der Membran erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 U/min für 1min. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 50-100µl Puffer EB auf die Säule pipettiert, 1min bei RT inkubiert und anschließend 1min bei 13.000 U/min zentrifugiert.

3.3.2.8.7 Restriktion

Mit Hilfe der Restriktionsenzymverdau wurde überprüft, ob in der Plasmidpräparation ein Insert nachweisbar ist.

Der auf Eis pipettierte Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

15 µl	Vector
1 µl	<i>HindIII</i>
1 µl	<i>PstI</i>
2 µl	NEB2
0,2 µl	BSA
ad 0,8 µl	A.bidest

Inkubation 120 Minuten bei 37°C.

3.3.2.9 Klonierung von pBluescript in pGL4

Nun wurde das in den pBluescript klonierte Fragment D5-218 (resp. Δ D5-218) auf gleiche Weise mittels Restriktionsenzymverdau ausgeschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und in pGL4 ligiert.

3.3.2.9.1 Restriktion

1-2 μ g Plasmid-DNA (je D5-218 und Δ D5-218 in pBluescript) wurden mit 2,5 Units entsprechenden Enzym (*Xho*I und *Bam*HI) unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen 90 min inkubiert. Die Restriktion des pGL4 erfolgte mit Hilfe von *Xho*I und *Bgl*III.

3.3.2.9.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von pGL4 und insert

Die analytischen Agarosegelelektrophoresen zur Separierung von DNA-Fragmenten nach Restriktion erfolgten wie unter 3.3.2.8.2 beschrieben.

3.3.2.9.3 Fragmentelution aus Agarosegelen

Die Isolierung und Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte unter den in 3.3.2.8.3 beschriebenen Bedingungen.

3.3.2.9.4 Ligation

Die Ligation der inserts D5-218 und Δ D5-218 mit pGL4 erfolgte unter den in 3.3.2.8.4 beschriebenen Bedingungen.

3.3.2.9.5 Transformation

Die Transformation der neuen Vektorkonstrukte in DH5 α erfolgte unter den in 3.3.2.8.5 beschriebenen Bedingungen.

3.3.2.9.6 Minipräparation von Plasmid-DNA

Vor der Mutagenese wurden anschließend mindestens 3 Klone gepickt und damit jeweils eine 4 ml Übernachtskultur inokuliert (LB-Medium, 100 μ g/ml Ampicillin). Nach 16 h Inkubation (37°C, 250 rpm) wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Plasmide nach Anleitung des Herstellers mit Hilfe von Qiaprep Spin Mini, Qiagen, Hilden, isoliert.

3.3.2.9.7 Restriktion

Zur Überprüfung, ob der Vektor das entsprechende Insert enthält, wurden 1-2 µg Plasmid-DNA (je D5-218 und ΔD5-218 in pGL4) mit 2,5 Units entsprechenden Enzym (*Hind*III) unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen 90 min inkubiert.

3.3.2.9.8 Verifizierung der Klone durch Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob das Fragment D5-218 (resp. ΔD5-218) tatsächlich erfolgreich in pGL4 kloniert wurde, wurde zusätzlich zum Restriktionsenzymverdau das Plasmid sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma SRD in Oberursel auf dem DNA-Sequenziergerät ABI PRISM 377 von der Firma Applied Biosystems in Foster City, Ca, USA durchgeführt.

3.3.2.10 *In vitro*-Mutagenese

Der humane TBG-Promotor befand sich nun vor dem Reporter-Gen *Firefly*-Luciferase im Vektor pGL4. Um zu untersuchen, ob die canine Sequenz eine Änderung der Transkriptionsaktivität bewirkt, musste die Sequenz der HNF-1-Bindungsstelle entsprechend der caninen Sequenz verändert werden. Dieses wurde durch eine *in vitro*-Mutagenese erreicht. Auf gleiche Weise wurde die Sequenz auch für die murine Sequenz verändert. Hierzu wurde das Mutagenese-Kit ‚Gene Tailor‘ der Firma Invitrogen benutzt.

3.3.2.10.1 Mutagenese-Reaktion

Das Produkt der *in vitro*-Mutagenese wird in kompetente Zellen transformiert. Diese verfügen über Methylasen, die methylierte DNA abbauen. In einem ersten Schritt wird dazu das zu mutierende Elternplasmid methyliert, was den Vorteil hat, das mittransformiertes, methyliertes Elternplasmid abgebaut wird. Das im Rahmen der Mutagenese entstehende, nun mutierte Plasmid ist nicht methyliert.

Die Methylierungs-Reaktion erfolgte mit Hilfe von DNA-Methylase in folgendem Ansatz aus Komponenten des GeneTailor-Mutagenesekits:

1,2 µl	Plasmid-DNA (D5-218 pGL4)
1,6 µl	Methyl-Puffer
1,6 µl	SAM
1,0 µl	DNA-Methylase
10,6 µl	A. bidest

Der Ansatz wurde 16-24 h bei 30°C inkubiert.

Gerichtete Mutagenese: Für eine site directed mutagenesis (SDM) werden Mutagenese-Primer benötigt, die sich an gleicher Stelle des Vektors gegenüber liegen (Abb. 11). Diese tragen die einzufügende Mutation ungefähr in der Mitte ihrer Sequenz. Wie in einer PCR werden die Mutagenese-Primer durch die Platinum-Taq[®] DNA-Polymerase verlängert, wobei die Mutagenese-Primer einschließlich der Mutation in den neu synthetisierten, nicht methylierten Tochterstrang inkorporiert werden. Der parentale, methylierte Strang bildet gemeinsam mit dem neu synthetisierten Strang ein doppelsträngiges Plasmid, das am 5'-Ende des Mutagenese-Primers einen Einzelstrangbruch trägt. Der Unterschied zu einer normalen PCR besteht darin, dass nur der parentale Strang amplifiziert wird. Lagert sich ein Mutagenese-Primer an einen Tochterstrang an, so kann er wegen des Einzelstrangbruchs am 5'-Ende des komplementären, inkorporierten Mutagenese-Primers nicht in 5'-3'-Richtung verlängert werden.

Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden die Komponenten des GeneTailor-Kits sowie die unter 3.1.4 angegebenen Primer zu folgenden Anteilen gemischt:

5 µl	10x Hifi-Puffer
2 µl	dNTP (10mM each)
1 µl	MgSO ₄ (50 mM)
1,5 µl	Forwardprimer (10 µM)
1,5 µl	Reverseprimer (10 µM)
2 µl	template
0,5 µl	Platinum-Taq
96,5 µl	A. bidest

Nach einer 2 minütigen Erwärmung auf 94° C wurde folgendes PCR-Programm gestartet:

A	Denaturierung der DNA	94°C für 30 sec
B	Annealing	55°C für 30 sec
C	Extension	68°C für 3 min 30 sec

1. A-C 20 Zyklen, 2. abschließende Extension 68°C 10 min, 3. Abkühlen auf 4°C

Die parentale DNA wird nach der SDM durch die in den kompetenten Zellen vorhandene Endonuklease, welche die methylierte Erkennungssequenz schneidet, verdaut, so dass nur die neu synthetisierten DNA-Stränge mit der eingefügten Mutation im Reaktionsansatz

verbleiben. Diese lagern sich zu einem doppelsträngigen Plasmid zusammen, dessen Strangenden nach einer erneuten Transformation in den DH5 α geschlossen werden.

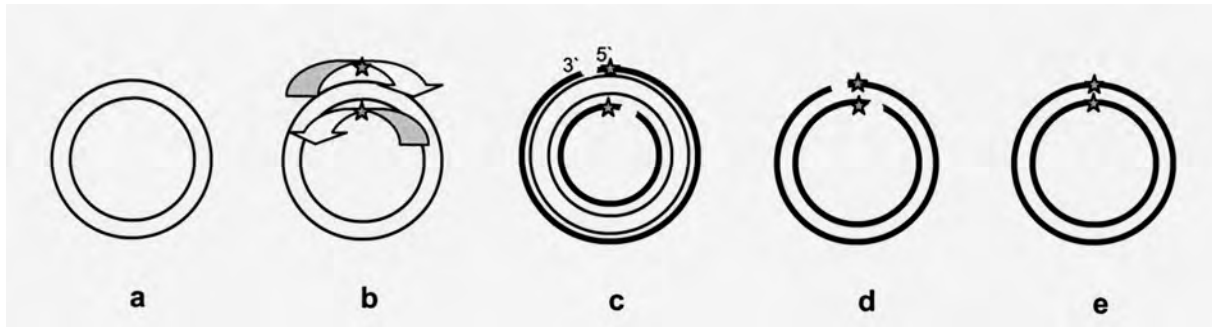


Abb. 11 *in vitro*-Mutagenese.

Ein doppelsträngiges, methyliertes Plasmid (a), welches das Insert enthält, in das eine Punktmutation (Stern) eingeführt werden soll, wird mit Hilfe von zwei sich gegenüberliegenden synthetisierten Oligonukleotidprimern (Pfeile in b), die die Mutation enthalten, in einer PCR amplifiziert. Die neu synthetisierten, nicht methylierten DNA-Stränge (c, fett) werden an ihren Enden nicht geschlossen („staggered nicks“). Nach Verdauung der ursprünglichen, methylierten DNA durch das Enzym DpnI (nicht gezeigt) bleiben die beiden komplementären, neu synthetisierten Stränge mit der eingeführten Mutation übrig (d). Nach der Transformation in DH5 α werden die Strangbrüche geschlossen.

3.3.2.10.2 Transformation

Für die Transformation wurden zu jedem 1,5 ml Reaktionsgefäß, das 50 μ l kompetente Zellen enthält, 4 μ l Mutagenese-Produkt gegeben, gut durchmischt und 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Zellen-DNS-Mix genau 42 sec bei 42°C inkubiert, erneut 2 Minuten auf Eis gestellt, 500 μ l steriles SOC-Medium (2% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,05% (w/v) Hefeextrakt, 0,05% (w/v) NaCl, 20 mM Glucose) dazugegeben und durchmischt. Bei der Transformation temperatursensitiver Plasmide erfolgte anschließend die Inkubation dieser Zellsuspensionen 60 min bei 37°C im Thermomixer. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden einerseits 100 μ l der Zellsuspensionen auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Weiterhin wurden weitere 340 μ l der Zellsuspension zentrifugiert, 240 μ l des Überstandes verworfen, die restlichen 100 μ l resuspendiert in einem zweiten Ansatz ausplattiert und ebenfalls bei 37°C bebrütet.

Jeweils 0,1 ml der transformierten Zellen wurden auf LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum (1,5% Agar in LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin oder/und 25 µg/ml Kanamycin) und 50 µl X-gal (20 mg/ml) ausgestrichen.

3.3.2.10.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Eine Plasmid-DNA Aufbereitung wurde wie unter 3.3.2.8.6 beschrieben vorgenommen.

3.3.2.10.4 Verifizierung der DNA-Konstrukte durch Sequenzierung

Die erfolgreiche Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft, diese wurde von der Firma SRD in Oberursel auf dem DNA-Sequenziergerät ABI PRISM 377 von der Firma Applied Biosystems in Foster City, Ca, USA durchgeführt.

3.3.2.11 Luciferase-Assay (TBG-Promotor-Aktivität)

Zur Untersuchung der Promotoraktivität verwendet man oft nicht das eigentlich zu untersuchende Gen, sondern nur den betreffenden Promotor und ein Reporter-gen; dieses kommt üblicherweise nicht in eukaryotischen Zellen vor. *Firefly*-Luciferase aus Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) ist ein solches Reporter-gen. Dieses Enzym bewirkt durch Oxidation seines Substrates, das *Beetle Luciferin*, eine Biolumineszenzfreisetzung. Für den TBG-Promotor-Assay wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega™ verwendet. Folgende Plasmidkonstrukte kamen zum Einsatz: zum einen ein Plasmid mit dem humanen TBG-Promotor vor dem *Firefly*-Luciferase-Gen (pGL4-D5-218) als Positivkontrolle, sowie das entsprechende Plasmid mit der vollständig zerstörten HNF-1-Bindungsstelle (pGL4-ΔD5-218) als Negativkontrolle für die Funktion der HNF-1-Bindungsstelle. Um den Einfluss der veränderten caninen HNF-1-Bindungsstelle zu bestimmen, wurde das durch Mutagenese hergestellte Plasmid pGL4-Hund eingesetzt, bei dem 3 nebeneinander liegende Nukleotide gegenüber der humanen Sequenz verändert sind. Ferner wurde ein Plasmid mit der murinen Sequenz entsprechenden und nur im einem Nukleotid von der humanen Sequenz abweichenden HNF-1-Bindungsstelle benutzt (pGL4-Maus). Als Leerkontrolle wurde auch der *Firefly*-Luciferasevektor pGL4 ohne inkloniertem Promotor gemessen. Mit allen Plasmiden wurde das *Renilla*-Luciferase-Plasmid RL-TK transfiziert, um eine Korrektur für die Transfektionseffizienz vornehmen zu können.

Die Expression der *Firefly*-Luciferase wird nach erfolgreicher Transfektion der TBG-Promotorkonstrukte in die Zelle über die zu prüfende Aktivität des TBG-Promotors reguliert.

Die Lumineszenz entsteht durch Oxidation des *Beetle Luciferins* unter Einwirkung der *Firefly*-Luciferase, wobei zusätzlich ATP, O₂ und Mg²⁺-Ionen vorhanden sein müssen. Durch die Anwesenheit von Coenzym A wird die Kinetik der Oxidation verbessert, so dass das Biolumineszenz-Signal über mehrere Minuten stabil bleibt. Ein zweites Plasmid, das Kontrollplasmid pRL-Null, wird zur Korrektur der Transfektionseffizienz kotransfiziert. Dieses enthält die konstitutiv exprimierte *Renilla*-Luciferase aus Wasserfarn (*Renilla reniformis*) (Matthews et al., 1977), gesteuert vom Promotor des Simian Virus (SV 40). Da dieser Promotor nicht von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird, sollte er unabhängig von den verschiedenen Stimuli aktiv sein und die Menge an transfiziertem Plasmid widerspiegeln.

Unter der Annahme, dass beide Plasmide gleichermaßen in die Zelle und in den Kern gelangen, kann also die Transfektionseffizienz mit Hilfe der konstitutiv exprimierten *Renilla*-Luciferase erfasst und bei der Auswertung berücksichtigt werden. Die *Renilla*-Luciferase stellt ein monomeres 36 kDa Protein dar, das ebenso wie die *Firefly*-Luciferase ohne posttranslationelle Modifikation aktiv ist. Die *Renilla*-Luciferase katalysiert die Oxidation von Coelenterazine unter Anwesenheit von O₂.

3.3.2.11.1 Zellkultur

Als Zelllinie diente die humane Hepatomzelllinie HepG2, die histologische und biochemische Charakteristika gut differenzierter Leberparenchymzellen aufweist. Ursprünglich wurde diese Zelllinie aus einer Biopsie eines Lebertumors gewonnen. Die HepG2-Zellen stellen die notwendigen Transkriptionsfaktoren zur Verfügung, die zur Expression in der Leber synthetisierter Proteine wie TBG notwendig sind, z.B. HNF-1.

Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Die Zelllinie wurde in einem Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Die HepG2 Zelllinie wurde in D-MEM-Medium gehalten. Das Kulturmedium erhielt 10% Kälberserum als Zusatz und weiterhin 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penicillin. Das fötale Kälberserum (FCS) wurde vor der Verwendung 30-60 min. bei 56°C zur Inaktivierung des Komplements inkubiert. Die Lagerzeit für die zusammengesetzten Medien sollte 4 Wochen bei 4°C nicht überschreiten.

Zellen wurden passagiert, wenn sie eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hatten. Dazu wurde zunächst das Medium aus der 6-well-plate abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Durch diesen Vorgang werden abgestorbene und bereits abgelöste Zellen sowie Reste des

Serums entfernt. Dann wurden die Zellen mit 1 ml 0,25% Trypsin/EDTA überschichtet und 2-3 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von Medium mit 10% FCS wurde das Trypsin inaktiviert, da sich im Serum eine ausreichende Menge an Trypsin-Inhibitor befindet. Durch mehrmaliges vorsichtiges Aufziehen mit einer 5 ml Pipette wurden die Zellen von der Unterlage gelöst. Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 3 min. bei 200 x g pelletiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in einer geringen Menge frischen Mediums gut resuspendiert und in eine frische 6-well-plate ausgesät.

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese zunächst trypsiniert und zentrifugiert wie oben beschrieben. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (Medium; 10% FCS; 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen transferiert. Die Zellen wurden anschließend 1,5 h auf Eis inkubiert und dann bei -80°C gelagert. DMSO wirkt als Gefrierschutzmittel und durch ein langsames Einfrieren und rapides Auftauen wird ein verstärktes Brechen von Zellmembranen verhindert.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Einfrieröhrchen zügig auf 37°C erwärmt bis die Flüssigkeit mit einem restlichen Eiskern in ein Falcon-Röhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Vollmedium überführt werden konnte. Die Suspension wurde 5 min. bei 300 x g abzentrifugiert um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Kulturschale transferiert.

3.3.2.11.2 Transfektion

Es stehen verschiedene Methoden für die transiente Einführung von DNA in eine eukaryotische Zelle zur Verfügung. Neben der Calcium-Phosphat-Methode (Graham und van der Eb, 1973), dem DEAE (Diethylaminoethyl)-Dextran-Verfahren (McCutchan und Pagano, 1968) und der Elektroporation (Neumann et al., 1982) kann die DNA auch unter Vermittlung von Liposomen (Felgner et al., 1987; Fraley et al., 1980) in die Zelle eingeführt werden.

Die Transfektion der verschiedenen DNA-Konstrukte wurde mittels Lipofektion mit Transfektionsreagenz TransFast™ (Promega) durchgeführt. TransFast™ enthält neben DOPE (L-Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin) das synthetische lineare Lipid [N,N,N',N'-Tetramethyl-N,N'-Bis(2-Hydroxyethyl)-2,3-Di(oleoyloxy)-1,4, Butandiammoniumjodid]. Dieses kationische Lipid lagert sich mit seinem kationischen Ende, der positiv geladenen Ammoniumgruppe, an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle an.

Zusammen mit dem fusogenen Lipid DOPE bilden sich Liposome, die mit der Zellmembran fusionieren können, wodurch die DNA in die Zelle und in den Zellkern gelangen kann.

Die HepG2-Zellen wurden auf 6-Lochplatten verteilt und nach 1-2 Tagen bei einer Konfluenz von 80% mit Vollmedium vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Lipofektion transient mit den entsprechenden DNA-Konstrukten, die die Luciferase als Reporter gen enthielten, und dem Kontrollplasmid pGL4 kotransfiziert. Pro 6-Loch wurden 1,8 µg des experimentellen Plasmids mit der Firefly-Luciferase als Reporter gen und 0,2 µg des Kontrollplasmids mit der Renilla-Luciferase als Reporter gen transfiziert. Für optimale Transfektionsbedingungen wurde das kationische Lipid TransFast™ (Promega) in einem Reagenz : DNA-Ladungsverhältnis von 2 :1 in 1000 µl Medium 1 h bei 37°C auf den Zellen belassen. Nach der Inkubation wurden je Loch weitere 2 ml Medium zugesetzt und die Platten 24-48 h bei 37°C inkubiert.

Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Passive Lysis Buffer (Promega) lysiert (500 µl pro Loch). Zur Unterstützung der Lyse wurden die Zellen in der 6-Loch-Platte 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach Herstellung von 50 µl-Aliquots werden diese 1 - 2 Mal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen endgültig zu sprengen. Die Untersuchungsproben wurden nach dem letzten Auftauen dem Luciferase-Assay zugeführt.

3.3.2.11.3 Luciferase-Assay am Luminometer

Zur Untersuchung der abhängig von der Promotoraktivität des TBG gebildeten Firefly-Luciferase und der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase wurde das Dual-Luciferase™ Reporter Assay System von Promega verwendet. Die Aktivitäten der Firefly- und der Renilla-Luciferase wurden am Luminometer bestimmt. Dazu wurden 20 µl Lysat vorgelegt. Nach Zugabe von 100 µl Luciferase Assay Reagenz II (LARII), das Beetle Luciferin enthielt, wurde die Biolumineszenz während 10 Sekunden gemessen. Durch Zugabe von 100 µl Stop&Glo®-Reagenz (Promega) wurde die Firefly-Luciferase gequencht und die Oxidation von Coelenterazine unter Einwirkung der Renilla-Luciferase gestartet. Die resultierende Biolumineszenz wurde über einen Zeitraum von 10 Sekunden gemessen. Die Promotoraktivität wurde somit gegen die Transfektionseffizienz korrigiert. Diese ergab sich als Quotient aus der Lumineszenz durch Wirkung der Firefly-Luciferase und der Lumineszenz, die durch die Renilla-Luciferase entstand.

4 Ergebnisse

4.1 Schilddrüsenhormonparameter beim Hund

In einer retrospektiven Analyse der Daten aus einem großen tiermedizinischen Einsenderlabor (BIOFOCUS, Recklinghausen) wurden die Schilddrüsenparameter von 658 Hunden ausgewertet. Da nicht bei allen Hunden alle Parameter bestimmt worden waren, konnten insgesamt 524 FT₄-Werte, 242 TT₄-Werte, 260 cTSH-Werte und 450 Cholesterin-Werte ausgewertet werden. Dabei fanden sich folgende Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Minimal und Maximalwerte (Tab. 2):

Tab. 2 Schilddrüsenfunktionsparameter von 658 Hunden

Parameter	MW ± SD	Min-Max-Bereich
FT₄	0,84 ± 0,43 ng/dl	von 0,01 – 6,56 ng/dl
=	10,75 ± 5,57 pmol/l	von 0,13 – 84,4 pmol/l
TT₄	20,31 ± 9,52 nmol/l	von 1 – 55 nmol/l
cTSH	0,37 ± 0,90 ng/ml	von 0,03 – 10,8 ng/ml
Cholesterin	299 ± 121 mg/dl	von 73 – 971 mg/dl

Offensichtlich wurde also die ganze Bandbreite der Schilddrüsenfunktionsparameter von der Euthyreose bis zur ausgeprägten Hypothyreose bei den untersuchten Hunden abgedeckt. Bis auf höhere cTSH-Werte bei Westhighland Terriern fanden sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Hunderassen (Abb. 12).

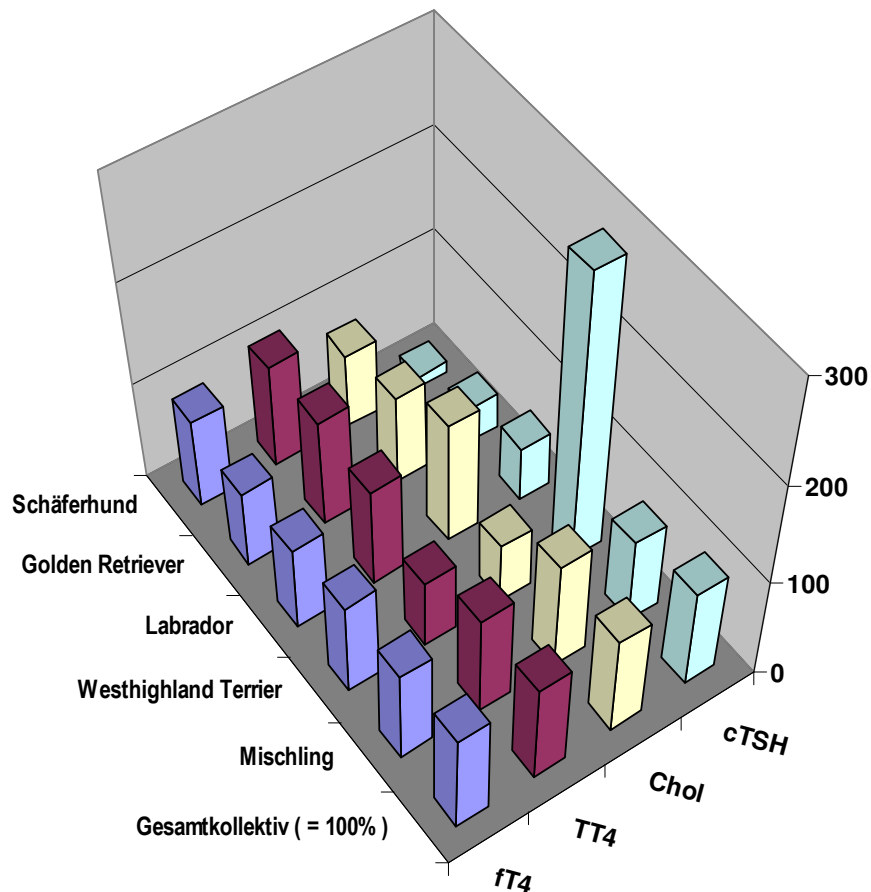


Abb. 12 Vergleich der Schilddrüsenfunktionsparameter verschiedener Hunderassen relativ zum Gesamtkollektiv.

Die Schilddrüsenparameter des Gesamtkollektivs wurden gleich 100% gesetzt (Absolutwerte siehe Tab. 2). Die Westhighland Terrier hatten auffallend hohe cTSH-Werte, alle anderen Unterschiede waren nicht signifikant.

4.2 Vergleich der Schilddrüsenparameter bei Hund und Mensch

Das Verhältnis der freien zu den totalen Thyroxinspiegeln im Serum der Hunde lag mit 1:2000 (FT_4 10,75 pmol/l : TT_4 20,31 nmol/l) deutlich höher als in einem umfangreichen Vergleichskollektiv (n = 4719, Zentrallabor, Universitätsklinikum Essen) menschlicher Serumproben, bei dem sich ein Verhältnis von 1:6400 fand (FT_4 15,89 pmol/l : TT_4 101,41 nmol/l; siehe Abb. 13).

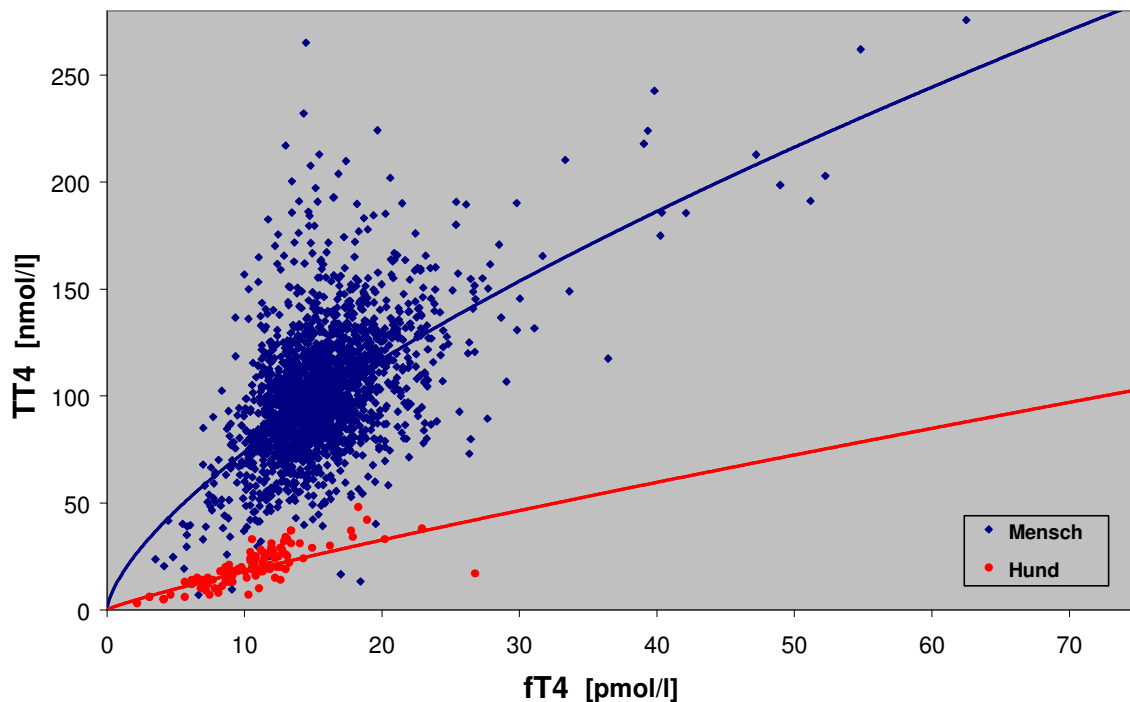


Abb. 13 Vergleich der Relation von fT_4 : TT_4 bei Mensch und Hund.

Die in rot dargestellte Kurve der Abhängigkeit des TT_4 von fT_4 beim Hund (117 Wertepaare) verläuft deutlich niedriger als die entsprechende Kurve beim menschlichen Serum (blau 4431 Wertepaare), d.h. für das gleiche fT_4 hat der Hund ein niedrigeres TT_4 als der Mensch. Zudem zeigen die TT_4 : fT_4 Paare beim Menschen eine erheblich größere Streuung, die bei diesem Kollektiv von Patienten eines Universitäts-Krankenhauses durch z.T. schwere, nicht-thyreoidale Erkrankungen, Medikamenteninteraktionen und akute Intervention mit Schilddrüsenhormonen oder Thyreostatika verursacht ist. Beide diese Effekte, der niedrigere TT_4 : fT_4 Quotient und die geringere Schwankungsbreite sprechen für das Fehlen des wichtigsten T_4 -Bindungsproteins TBG beim Hund.

Der Anteil des fT_4 war bei den Hunden also relativ gesehen höher als beim Menschen. Die einfachste Erklärung ist eine geringere Schilddrüsenhormonbindungskapazität beim Hund, zunächst musste aber eine unterschiedliche Wirksamkeit von fT_4 bei Hund und Mensch ausgeschlossen werden. Dazu wurde die Relation der fT_4 und TT_4 Werte zum TSH bei Hund und Mensch verglichen (siehe Abbildungen 14 und 15). Da hierbei nur der Unterschied der Relation des fT_4 und TT_4 zum TSH eine Rolle spielt war es ohne Bedeutung, dass sich der menschliche TSH Assay nicht direkt mit dem caninen TSH Assay vergleichen ließ. Um das canine TSH zahlenmäßig mit dem menschlichen vergleichen zu können, wurden die in ng/ml angegebenen Werte des cTSH mit einem arbiträren Faktor von 10 multipliziert. Daraus ergab

sich für das „korrigierte“ cTSH ein Referenzbereich von 0–6 ng/10ml und für das menschliche TSH ein Referenzbereich von 0,3–3,0 mU/l.

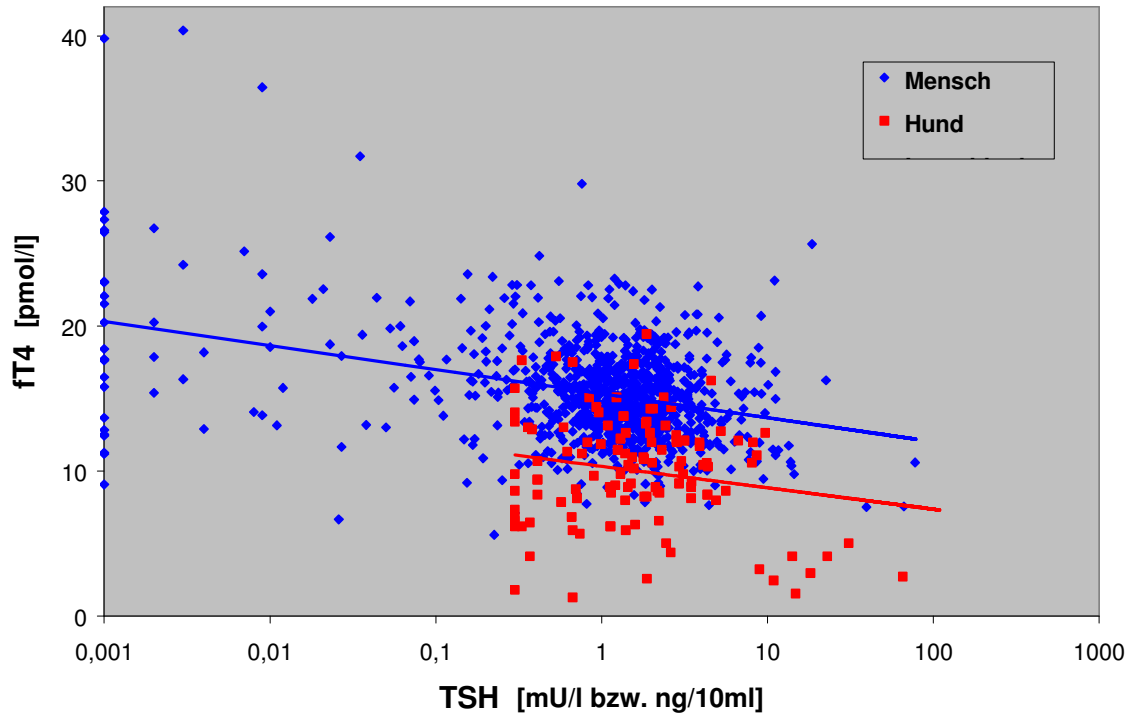


Abb. 14 Relation der FT₄-Werte zum TSH bei Mensch und Hund.

Die Regressionsgeraden von fT₄ : TSH von Mensch und Hund verlaufen fast parallel, nachdem die Werte für das Hunde-TSH der besseren Darstellbarkeit um den arbiträren Faktor x10 korrigiert wurden. Trotz der durch den Regelkreis vorgegebenen Abhängigkeit von TSH und T₄ ergeben sich nur sehr schlechte Korrelations-Koeffizienten von $r^2=0,12$ für die Proben vom Menschen und $r^2=0,04$ für die vom Hund. Beim Menschen ist dies durch die Interaktionen mit Medikamenten und dem hohen Anteil schwer kranker Patienten in diesem Kollektiv bedingt. Die noch schlechtere Korrelation beim Hund ist z.T. durch die schlechte Sensitivität des cTSH-Assays bedingt.

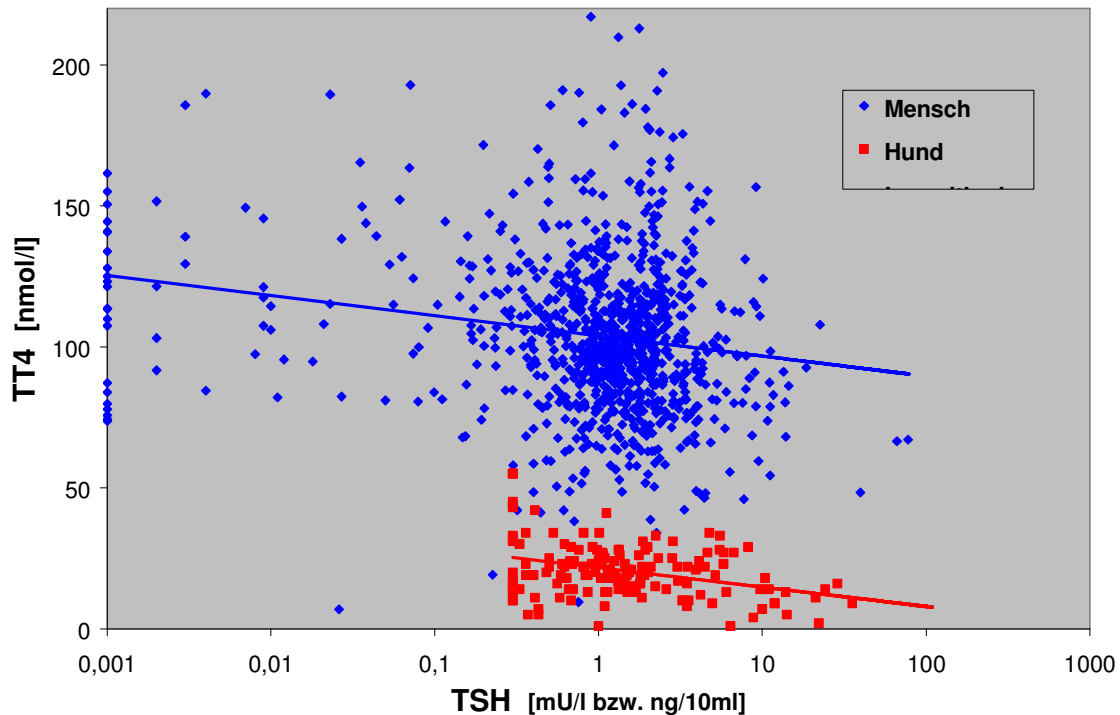


Abb. 15 Relation der TT_4 -Werte zum TSH bei Mensch und Hund.

Bei gleicher Korrektur der cTSH-Werte findet sich beim Vergleich der TT_4 :TSH-Regressionsgeraden ein sehr viel größerer Unterschied als bei den fT_4 :TSH-Werten (Abb.14). Dies entspricht dem Fehlen eines Bindeproteins. Aufgrund der um etwa 70% verminderten TT_4 -Bindung kann es sich dabei nur um TBG handeln. Dafür spricht auch die erhebliche Streuung der humanen TT_4 -Werte ($r^2=0,03$), da die T_4 -Bindung des TBG empfindlich auf nicht-thyreoidale Erkrankungen und Medikamenteninteraktionen reagiert. Die Korrelation ist bei den Hundewerten allerdings kaum besser ($r^2=0,11$), was z.T. durch die schlechte Sensitivität des cTSH-Assays bedingt ist. Entscheidend ist hier jedoch nur der größere Unterschied in den TT_4 : TSH im Vergleich zu fT_4 : TSH Werte als Hinweis auf das Fehlen von TBG beim Hund.

Sowohl die fT_4 als auch die TT_4 -Werte verlaufen relativ zum TSH bei Mensch und Hund parallel. Da der Abfall der Schilddrüsenhormone zu einem vergleichbaren Anstieg des TSH führt, kann nicht von einem unterschiedlichen Regelkreis ausgegangen werden. Der größere Unterschied in den TT_4 als fT_4 -Werten entspricht möglicherweise einer unterschiedlichen Schilddrüsenhormonbindungskapazität.

4.3 TBG-Assay (spezifischer T₄-Bindungstest)

Von den drei Bindungsproteinen für Schilddrüsenhormone, Albumin, Transthyretin (TTR) und Thyroxin-bindendes Globulin (TBG) hat TBG die größte Bedeutung, weil es bei den meisten Säugetieren für mehr als 70% der T₄-Bindungskapazität verantwortlich ist. Mittels eines T₄-Bindungstest wurde untersucht, ob sich in verschiedenen Hundeseren TBG nachweisen lässt. Durch die Verwendung von Barbituratpuffer wurde dabei gewährleistet, dass der Bindungsassay für TBG spezifisch ist, da Barbiturate T₄ von den Bindungsstellen des TTR und Albumin verdrängen (Murata et al., 1985).

Im Vergleich mit einem menschlichen Kontrollserum (arbiträr als 100% gesetzt) hatten mehr als zwanzig verschiedene Hundeseren nur eine unspezifische T₄-Bindungskapazität zwischen 3 und 9 % (Mittelwert 7 ± 3 %), vergleichbar mit dem Serum anderer Säugetiere, die kein TBG haben, wie Totenkopffaffe, Wildesel, Wolf, Tiger, Gepard, Katze, Braunbär, Ratte und Maus (Abbildung 16). Hierbei handelt es sich um unveröffentlichte Daten aus dem Labor von PD. Dr. O.E. Janßen.

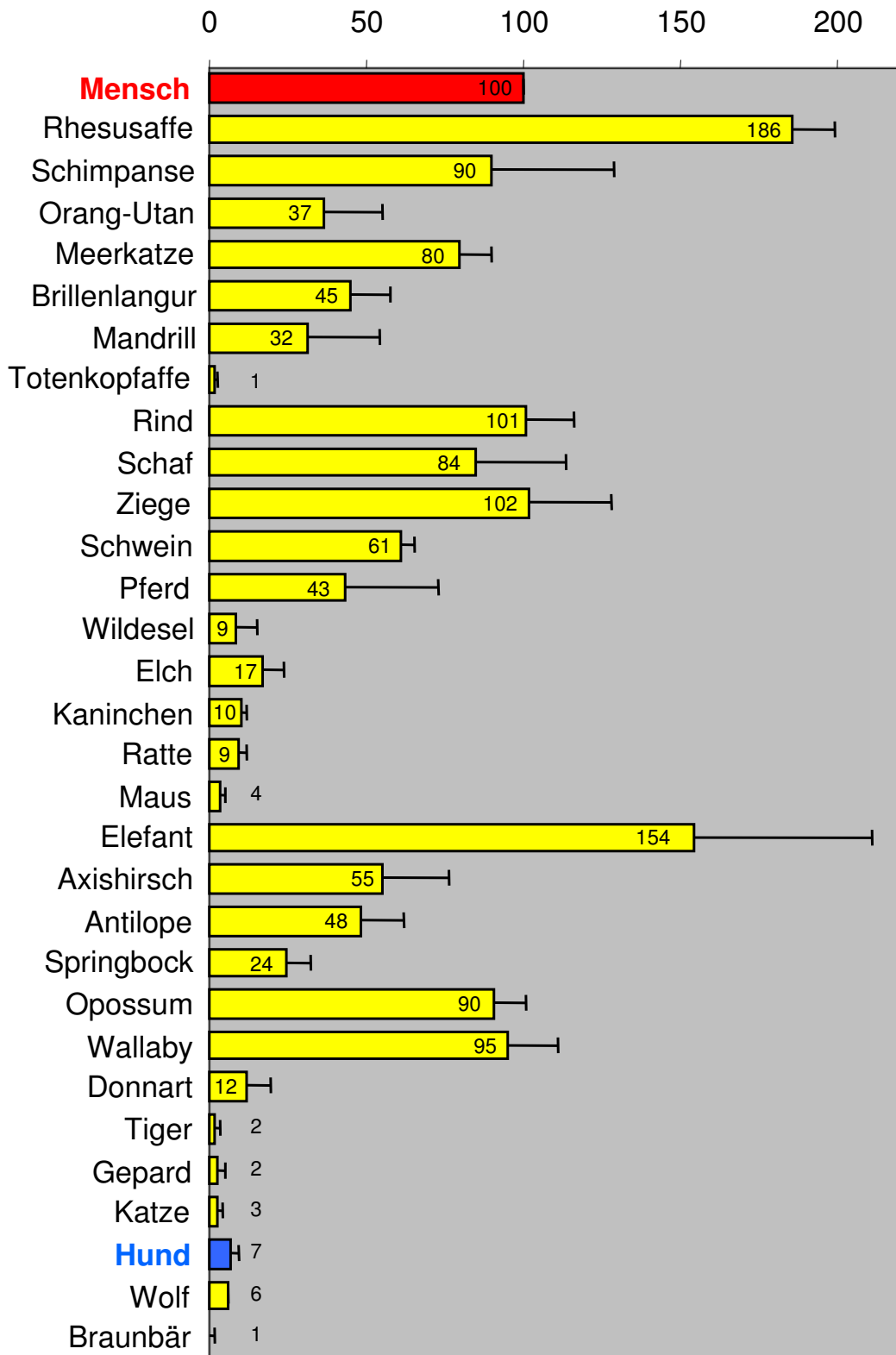


Abb. 16 Relative Bindungskapazität von T4 zu TBG bei verschiedenen Säugetieren. (Mensch arbiträr = 100 % gesetzt).

4.4 Sequenzierung des TBG-Gens

Das Fehlen von TBG im Serum des Hundes legt einen Synthese- oder Sekretionsdefekt nahe. In Analogie zum menschlichen TBG kommen dabei Transportdefektmutationen im TBG-Gen in Frage. Das komplette Fehlen von TBG (so genannte complete deficiency Varianten, TBG-CD) wird beim Menschen durch Punktmutationen, Frameshift-Mutationen und Splicesite-Mutationen im TBG-Gen hervorgerufen. Daher wurde zur weiteren Untersuchung der Ursache des Fehlens von TBG beim Hund zunächst das Hunde TBG-Gen sequenziert. Die Strategie ist in Material und Methoden unter 3.3.2.6 erläutert. Von drei verschiedenen Hunden wurden insgesamt 16 TBG-Gen Sequenzen gewonnen, die zusammen mit 14 der 18 BLAST-Sequenzen mit dem SeqMan-Programm (Lasergene 6, DNASTAR, Madison WI, USA) zu einem genomischen caninen TBG CONTIG zusammengesetzt wurden (siehe Abb. 17). Mittlerweile ist die zweite Version der vorläufigen, kompletten Sequenz des Genoms von einer Boxer-Hündin (*Canis familiaris*) im Internet im NCBI Entrez Nucleotide Server verfügbar. Mit der uns bekannten cTBG-Sequenz ließ sich das bisher nicht markierte canine TBG-Gen auf dem X-Chromosom in der whole genome shotgun sequence NW_879563.1 im Bereich 30968500 bis 30978500 identifizieren und damit unsere TBG-Sequenz verifizieren (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&qty=1&c_start=1&list_uids=NW_879563.1&uids=&dopt=fasta&dispmax=5&sendto=&from=30968500&to=30978500&strand=on). In Analogie zu den Exon-Intron Grenzen im menschlichen TBG ließ sich dann eine cDNA und die Aminosäuresequenz (Abb. 18) des caninen TBG ableiten.

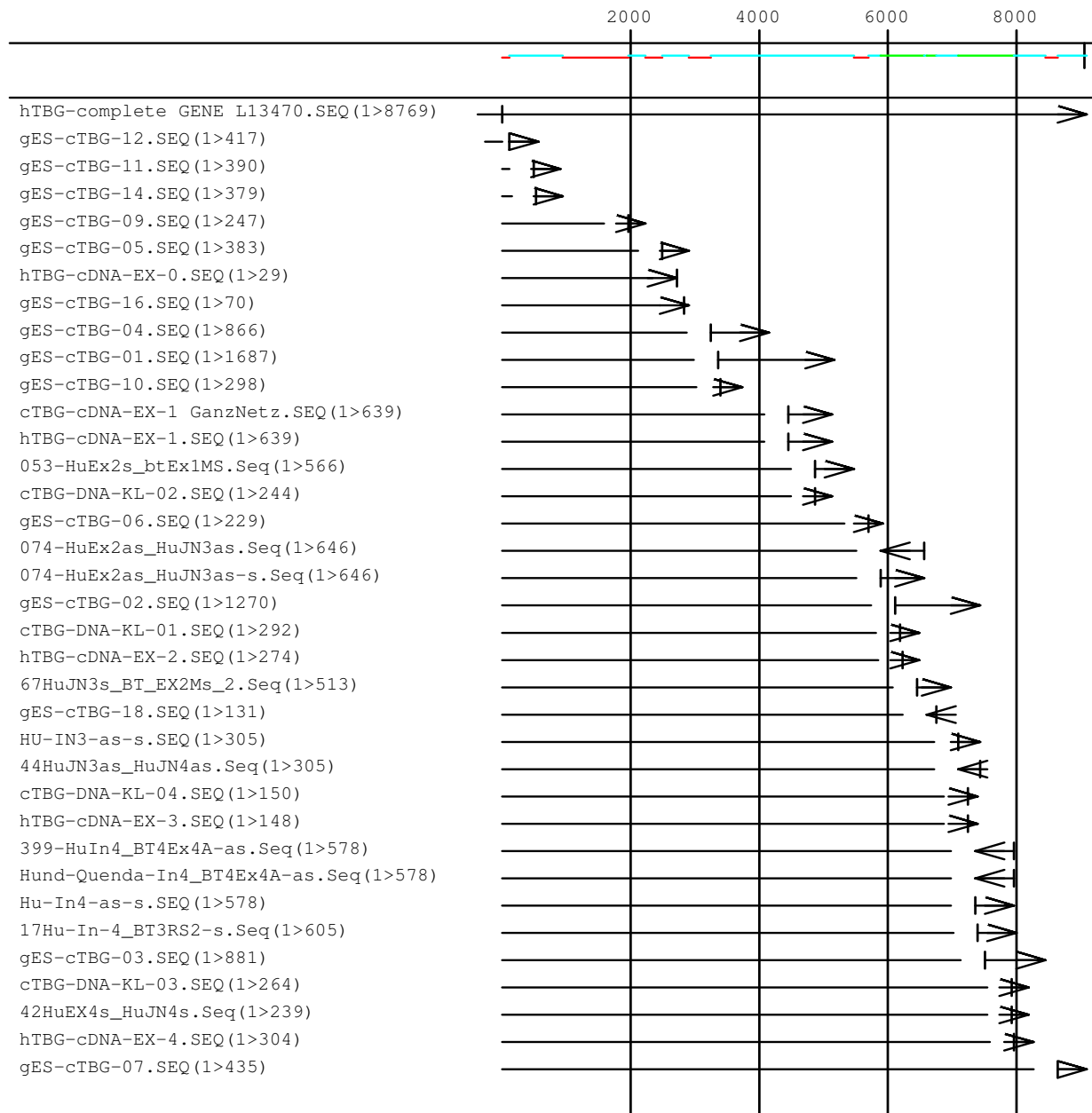


Abb. 17 CONTIG des TBG-Gens des Hundes mit humaner TBG Federsequenz.

hTBG = humanes TBG, cTBG = canines TBG, gES = BLAST-Sequenzen, EX-1 bis EX-4 = Exon 1 bis 4, alle weiteren Sequenzen sind von PCR-Amplifikationen genomischer Hunde-DNA abgeleitet.



Abb. 18 cDNA und Aminosäuresequenz des caninen TBG.

Die kleinen roten Dreiecke markieren den Beginn der Exone 0 bis 4, das offene Dreieck markiert den Beginn des Signalpeptids (Aminosäuren -16 bis -1), das solide Dreieck markiert den Beginn des reifen TBG Moleküls (397 Aminosäuren).

Im Vergleich mit anderen bekannten TBGs fanden sich keine offensichtlichen, schwerwiegenden Mutationen oder Frameshifts in der cDNA oder in der Aminosäuresequenz, die einen Synthese- oder Sekretionsdefekt des caninen TBG erklären konnten. Allerdings fand sich im mitsequenzierten Promotorbereich, 68 Basenpaare vor Exon 0, im Bereich des leberspezifischen Transkriptionsfaktors HNF-1 (hepatocyte nuclear factor-1) im Vergleich zur TBG-Sequenz des menschlichen TBG eine 3-Basenpaar Substitution TTA → GAG. Bei der Maus findet sich in diesem Bereich die Sequenz TTG. Aus früheren Untersuchungen am menschlichen TBG-Gen war bekannt, dass schwerwiegende Veränderungen an der HNF-1 Bindungsstelle eine TBG-Synthese *in vitro* verhindern (Hayashi et al., 1993), umgekehrt aber die einzelne Punktmutation in der HNF-1 Bindungsstelle im TBG-Gen der Maus *in vivo*, zumindest in der Perinatalphase und im Senium, nicht verhindern (Vranckx et al., 1994; Vranckx et al., 1990b). Zunächst wurde daher der HNF-1 Defekt im Promotor des cTBG bei drei verschiedenen Hunden durch PCR-Amplifikation und Sequenzierung mit spezifischen Primern (siehe Material und Methoden) verifiziert, und, weil genomische DNA vorhanden war, auch im Leoparden nachgewiesen (Abbildung 19).

MAN	ttcctgctgcctcttgggtgttttggcctatggccctattctgctgtaagacactcttgccagatggacttaaaacccctccagctctgacaactct	T
H21		
LPD		
MAN	ctttctcttttggttttacatgaagggtctggcagccaaagcaatcaactcaaaagttcaaaccttatcatttttttggcttctctctcttggccttgggtttg	↑
CHP	tttacatgaagggtctggcagccaaagcaacaat-aaagttcaaaccttatcatttttttggcttctctctctctccctctTAAGgttttgg	
MSE	taaccagagtacaaaaccttaatttttaagccctttttttccacttggtctttgttttg	
DOG	ctttctcttttggtatagatgaaggatctggcagctaaagcaaatctcagagttctatccttatcatttttcaacttggcttggccttgggtttg	
H21	TTCT TCCTGATCATTTTTCaCTTTGTTCTTATTGGCCTTGGCTTGT	
H22	CTTTCTCTTTTGTATA GATGAAGGATTTGGCAGCTAAAGCAA TCA TTCA GAGTTCTA TCCCTTATCA TTTTTTCA CTTTGTCTTA TTGGCCTTGGTTTGG	
H92	CTTTCTCTTTTGTATA GATGAAGGATTTGGCAGCTAAAGCAA TCA TTCA GAGTTCTA TCCCTTATCA TTTTTTCA CTTTGTCTTA TTGGCCTTGGTTTGG	
LPD	CTTTCTCTTTTGTATA GATGAAGGATTTGGCAGCTAAAGCAA TCA TTCA AAGTTCTA TCTTTTATCA TTTTTTCA CTTTGTCTTCC TTTTGGCCTTGA TTTTGG	
MAN	tacatcagctttgaaaaataccatcccagggttaatgctgggGTTAAA TTTTATAA ACTaagagtgctctagttttGCAAT acaggacatgcTATAAA aaatgga	
CHP	tacatcagctttgaaaaataccatcccagggttaatgctgggGTTAAA TTTTATAA ACTaagagttttctagttttGCAAT acaggacatgcTATAAA aaatgga	
MSE	tgcacagctttgcaaatgtcatccagagttcatggcatgGTTAAA TTTG TAAACcaggaatgctctagttttGCAAT agaggcatgtTATAAA agactga	
DOG	tgcacagctttgaaaaatcatcccagggttaatgctgggGTTAAA TGA TAACTaagagtgctctatcattttGCAAT acaggacatgtTATAAA agatgga	
H21	TGCATCAGCTTTGAAAATA TCA TCCCA GGGTTAA TGCTGGGGTTAA TGAG TAACTAAAGTGCCTA CTTTGGCAATACTGGa CATGTTATAAAGATGGA	
H22	TGCATCAGCTTTGAAAATA TCA TCCCA GGGTTAA TGCTGGGGTTAA TGAG TAACTAAAGTGCCTA CTTTGGCAATACTGGa CATGTTATAAAGATGGA	
H92	TGCATCAGCTTTGAAAATA TCA TCCCA GGGTTAA TGCTGGGGTTAA TGAG TAACTAAAGTGCCTA CTTTGGCAATACTGGa CATGTTATAAAGATGGA	
LPD	TGGCTCAGCTTTTGAAACA TATCA TCTCAGAGTTAACGGCTGGGGCTTAA TGAG TAACTAAAGTGCATCTACTTTTGGCAAT GTTATAA AGATGGA	
MAN	aagatgttgctttctgagAGATGCAAGTGTGATTCCTTGGCATTGCT	Exon 0
CHP	aagatgttgctttctgagAGATGCAAGTGTGATTCCTTGGCATTGCT	
MSE	atggtgttgctatctgagAGATGCAAGTGTGCTTCTTGGCCATGCT	
DOG	aagatgttgctttctgagAGATACAGTAGCTTCTTGGACATGCT	
H21	AAGATTTTGTCTTGAGAGATaCAAGTcGCTTCTTTGGACATGCTGCTA	
H92	Aa	
LPD	AAGATT	

Abb. 19 Sequenzvergleich des TBG-Promotors.

MAN = Mensch, CHP = Schimpanse, MSE = Maus, DOG = Hund, H21, H22 und H92 drei verschiedene Hunde, LPD = Leopard, HNF-1 = Bindungsstelle für den hepatocyte nuclear factor-1. Die Nukleotidsubstitutionen im HNF-1 im Vergleich zum menschlichen TBG sind rot, die CAAT-Box grün und die TATA-Box blau dargestellt. Der Beginn der cDNA des TBGs ist mit Exon 0 markiert.

4.5 Charakterisierung der Expression des TBG-Promotors vom Hund im Vergleich mit dem vom Menschen und dem der Maus

Aus früheren Arbeiten zur Charakterisierung des TBG Promotors war bekannt, dass die Mutation der HNF-1 Bindungsstelle die Expression des humanen TBG verhindert (Hayashi et al., 1993). Damit kam die Substitution von drei Nukleotiden in der HNF-1 Bindungsstelle des TBG-Promotors des Hundes als mögliche Ursache des Synthesedefektes in Frage, mußte aber von der Substitution des einzelnen Nukleotides in der HNF-1 Bindungsstelle im TBG Promotor der Maus abgegrenzt werden.

4.5.1 Klonierung der humanen TBG-Promotor-Sequenz aus pCAT über pBluescript in pGL4

Als Ausgangspunkt für die Klonierung eines Vektors zur Überprüfung der Promotoraktivität im Luciferaseassay stand ein pCAT Plasmid mit der menschlichen TBG Promotorsequenz von Position -218 bis -1 sowohl als Wildtyp (humaner TBG-Promotor, hTP) als auch mit inaktivierter HNF-1 Bindungsstelle (Δ -hTP) zur Verfügung (pCAT-hTP bzw. pCAT- Δ -hTP). Aufgrund inkompatibler Restriktionsschnittstellen war eine direkte Umklonierung nicht möglich, so dass die Klonierung über den Shuttlevektor pBluescript in den Expressionsvektor pGL4 erfolgte. Eine schematische Darstellung der Umklonierung ist in Abbildung 20 dargestellt.

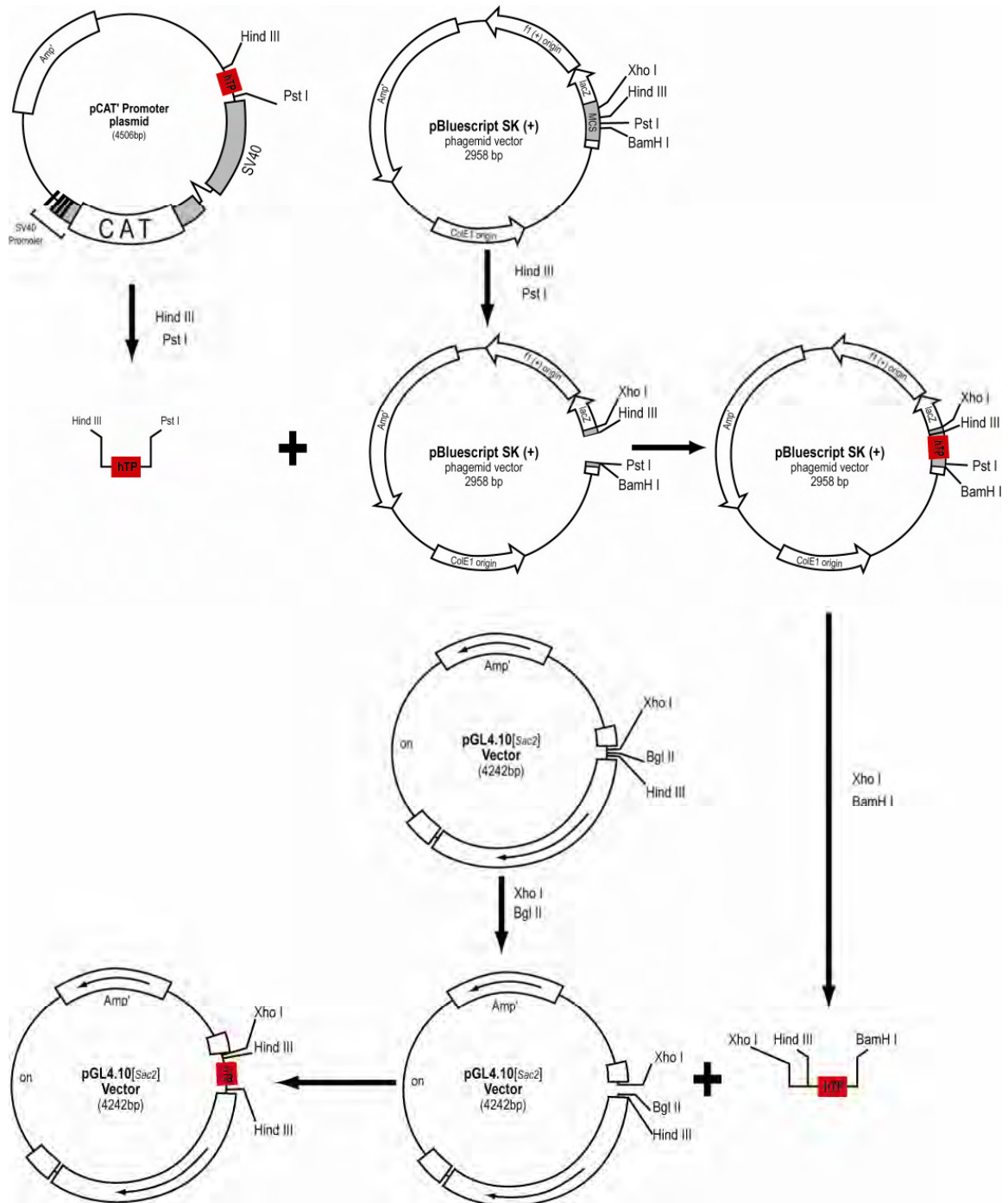


Abb. 20 Schematische Darstellung der Umklonierung des humanen TBG-Promotors.

pCAT ist ein Reporterplasmid mit einer Simianvirus 40 (S40) Promotor-abhängigen Chloramphenicol Acetyltransferase-Aktivität, mit dem der humane TBG-Promotors (hTP) und Δ -hTP (inaktivierter hTP) untersucht worden war (Hayashi et al., 1993). pBluescript ist ein Shuttlevektor. pGL4 ist ein Expressionsvektor mit dualer Luciferase-Reportersystem. Hind III, Pst I, Xho I, BamH I und Bgl II sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen.

Zunächst wurde der hTP sowie parallel der Δ -hTP mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und PstI aus pCAT herausgeschnitten, aufgereinigt (siehe Gelelektrophorese A in Abbildung 21) und in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnittenen pBlueskript (siehe Gelelektrophorese B in Abbildung 21) ligiert. Nach Transformation und Vermehrung in *E. coli* XL-1 blue wurde die erfolgreiche Einklonierung durch Restriktionsenzymverdau mit HindIII und PstI mittels analytischer Gelelektrophorese überprüft (siehe Abbildung 22).

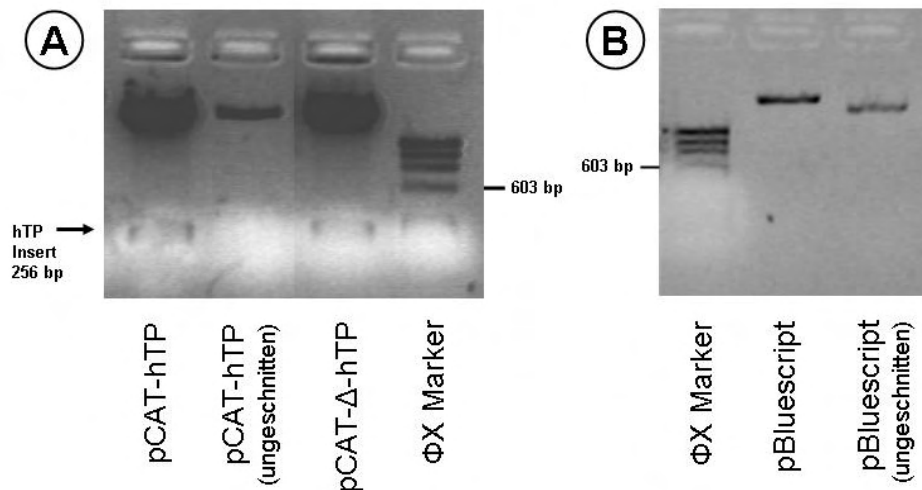


Abb. 21 Analytische Gelelektrophorese zum Nachweis des erfolgreichen Restriktionsenzymverdaus von pCAT-hTP und pCAT- Δ -hTP (A) und des Shuttlevektors pBluescript (B) mit HindIII und PstI.

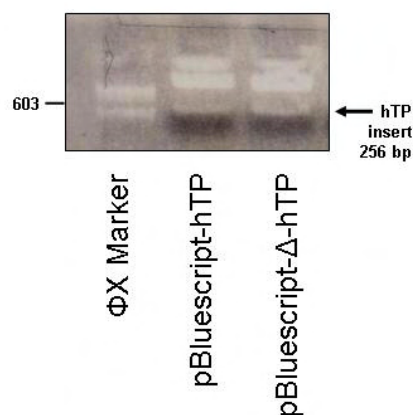


Abb. 22 Analytische Gelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Einklonierung von hTP bzw. Δ -hTP in den pBluescript Shuttlevektor.

Nach Verdau mit HindIII und PstI lässt sich das hTP bzw. Δ -hTP Insert von 256 bp Länge nachweisen.

Aus dem Plasmid pBluescript wurde dann der hTP sowie parallel der Δ -hTP mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und BamHI herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pGL4, der mit XhoI und BglII geschnitten worden war, hineinkloniert. BamHI (G><GATCC) und BglII (A><GATCT) erzeugen die gleichen sticky ends (GATC) und sind damit für eine Ligation kompatibel, allerdings gehen dabei die ursprünglichen Erkennungssequenzen verloren (G><GATCT), so dass anschließend eine Restriktion mit BamHI oder BglII nicht mehr möglich ist. Aufgrund einer 5' HindIII Restriktionsstelle im hTP bzw. Δ -hTP und einer 3' HindIII Restriktionsstelle im pGL4-Vektor konnte das Insert jedoch zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung und Vermehrung in *E. coli* DH5 α mit dieser Restriktionsendonuklease herausgeschnitten werden (siehe analytische Gelelektrophorese in Abbildung 23). Bei beiden Konstrukten (pGL4-hTP und pGL4- Δ -hTP) wurde mittels automatisierter Sequenzierung überprüft, dass die hTP bzw. Δ -hTP Sequenz jeweils der Ausgangssequenz entsprach.

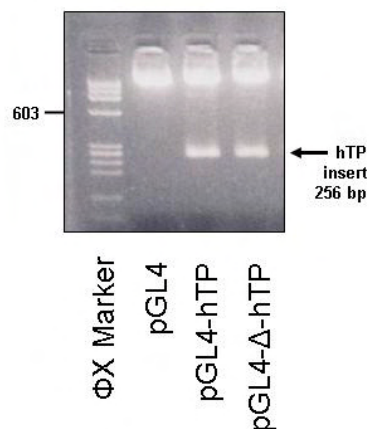


Abb. 23 Analytische Gelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Einklonierung von hTP bzw. Δ -hTP in den pGL4 Expressionsvektor.

Nach Verdau mit HindIII läßt sich das hTP bzw. Δ -hTP Insert von 256 bp Länge nachweisen.

4.5.2 Konstruktion von Hund- und Maus-spezifischen HNF-1 Bindungsstellen im TBG-Promotor

Mittels gerichteter Mutagenese wurden die drei Nukleotidsubstitutionen der HNF-1 Bindungsstelle des TBG-Promotors vom Hund, bzw. die eine Nukleotidsubstitution bei der Maus in den pGL4-hTP eingeführt und als pGL4-cTP (caniner HNF-1 TBG-Promotor) und

pGL4-mTP (muriner HNF-1 TBG-Promotor) bezeichnet (siehe Methodenteil 3.3.2.10.1). Alle Konstrukte wurden durch automatisierte Sequenzierung überprüft.

4.5.3 Expression der TBG-Promotor Konstrukte in HepG2-Zellen

Als eukaryotisches Expressionssystem wurden HepG2 Zellen mit dem pGL4 Dual-Luciferase-Reportersystem mit den Reportergenen der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase verwandt. Alle TBG-Promotor Konstrukte (human: pGL4-hTP, human mit inaktiviertem HNF-1: pGL4- Δ -hTP, canin: pGL4-cTP und murin: pGL4-mTP) sowie der pGL4 als leerer Vektor wurden jeweils parallel mit dem Kontrollplasmid pRL-Null mittels Lipofektion unter Verwendung von TransFast™ in die Zellen transfiziert (siehe Methodenteil). Die Biolumineszenz von *Beetle Luciferin* wurde dabei durch die TBG-Promotor abhängige *Firefly*-Luciferase der pGL4 Konstrukte verursacht. Die konstitutive Expression der *Renilla*-Luciferase durch das Kontrollplasmid pRL-Null ermöglichte durch die Bestimmung der Biolumineszenz von *Coelenterazine* eine Korrektur der Menge an transfizierter DNA für jeden einzelnen Versuchsansatz, indem die *Firefly*-Luciferaseaktivität relativ zur *Renilla*-Luciferaseaktivität angegeben wird (RLA = relative Luciferaseaktivität, gemessen in relativen Luciferaseaktivitätseinheiten RLE). Mehrfachmessungen (N=3) ergaben im Durchschnitt einen Variationskoeffizienten der RLA von weniger als 10% für die aktiven und weniger als 30% für die inaktiven Promotorkonstrukte, wie am Beispiel des normalen TBG-Promotors vom Menschen und am durch Mutationen in der HNF-1 Bindungsstelle inaktivierten Promotors gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 24).

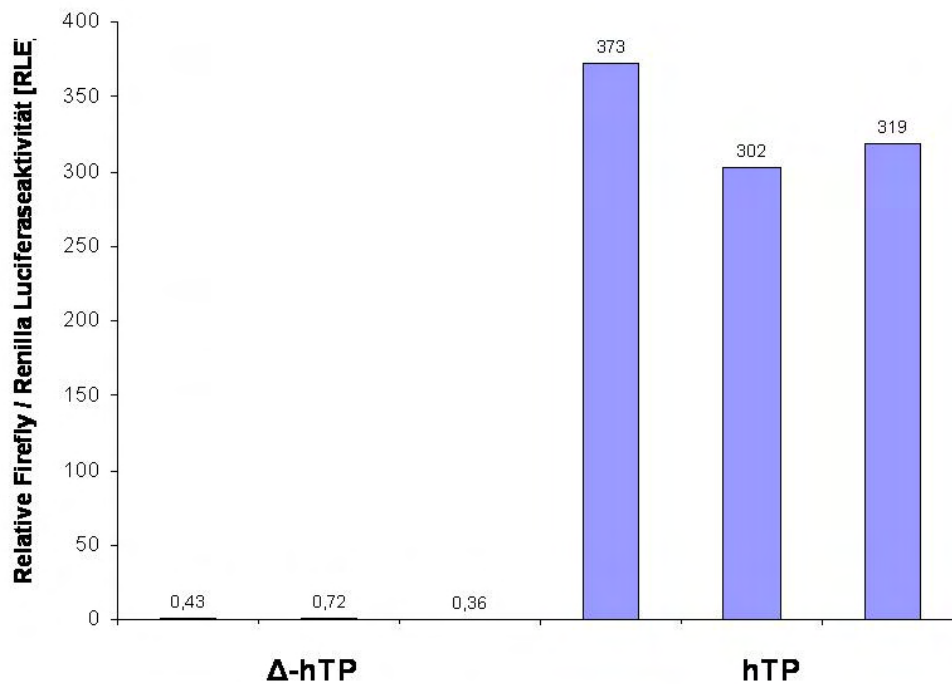


Abb. 24 TBG-Promotoraktivität mit aktiver und inaktiverter HNF-1 Bindungsstelle vom Menschen.

Die relative Luciferaseaktivität des humanen TBG-Promotors mit normaler HNF-1 Bindungsstelle (hTP, GTTAATTTATAAC) lag im Mittel bei 331 RLE, die durch Mutationen inaktivierte HNF-1 Bindungsstelle (Δ -hTP, ATCGAGATCTTCA, Mutationen rot markiert) hatte im Mittel eine Aktivität von 0,5 RLE. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente.

Die Expression der verschiedenen TBG-Promotor Konstrukte zeigte eine vergleichbar gute Aktivierung der Firefly-Luciferase durch die nur mit einer Nukleotid-Substitution veränderte HNF-1 Bindungsstelle der Maus im Vergleich mit der humanen HNF-1 Bindungsstelle, jedoch keine nennenswerte Aktivierung durch die Verwendung der Sequenzen vom Hund oder der durch Mutationen inaktivierten HNF-1 Sequenz, bzw. durch den als Kontrolle eingesetzten pGL4 Leervektor (siehe Abbildung 25). Als Ursache des Fehlens von TBG beim Hund konnte also ein Defekt in der HNF-1 Bindungsstelle im Promotor des TBG Gens nachgewiesen werden.

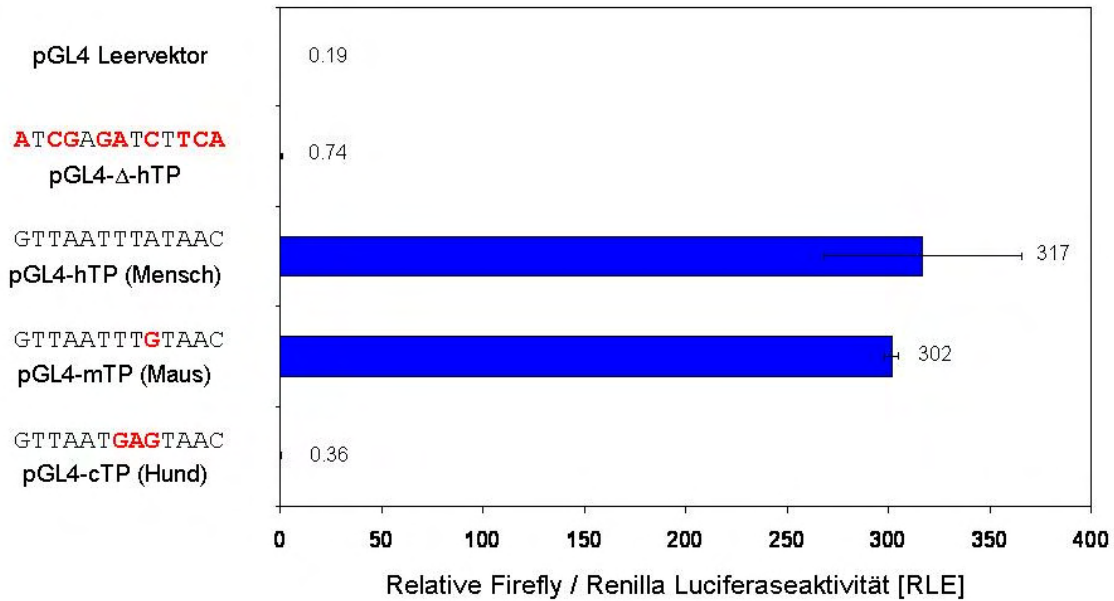


Abb. 25 TBG-Promotoraktivität verschiedener HNF-1 Bindungsstellen.

Die relative Luciferaseaktivität des TBG-Promotors mit der HNF-1 Bindungsstelle der Maus (mTP) unterschied sich nicht wesentlich von der des Menschen (hTP). Der leere pGL4 Vektor und die Promotor Konstrukte mit inaktivierter humaner HNF-1 Bindungsstelle (Δ -hTP) oder der HNF-1 Bindungsstelle vom Hund (cTP) zeigten keine relevante Aktivierung der Firefly-Luciferase. Die Mutationen der HNF-1 Bindungsstellen sind rot markiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

5 Diskussion

Die Schilddrüsenfunktion des Hundes wird von zwei Mechanismen dominiert, zum einen von einer sehr effizienten Schilddrüsenhormonsynthese und zum anderen einem ausgeprägten Ausscheidungsmechanismus für Schilddrüsenhormone. Dabei ist die erste durch den letzteren bedingt, um den hohen Umsatz an Schilddrüsenhormonen auszugleichen. Der im Vergleich zu anderen Säugetieren sehr hohe tägliche Bedarf an Schilddrüsenhormonen kommt beim Hund bei einer Erkrankung der Schilddrüse zutage: Bei Versiegen der endogenen Schilddrüsenhormonsynthese im Sinne einer Hypothyreose haben schon mittelgroße Hunde einen Substitutionsbedarf von 400 µg Thyroxin täglich, große Hunde benötigen zum Teil über 600 µg täglich, üblicherweise auf zwei Tagesdosen verteilt (Chastain, 1995; Dixon et al., 2002). Die Erhaltungsdosis unter Therapie richtet sich nach dem Verschwinden der Symptome sowie nach dem Ergebnis der Bestimmung der Schilddrüsenhormon-Spiegel im Blut. Wegen des schnellen Schilddrüsenhormon-Metabolismus ist der Hund relativ unempfindlich für eine Thyreotoxikose. Dementsprechend kommt eine Hyperthyreose beim Hund nur extrem selten vor.

Die Hypothyreose stellt beim Hund die am häufigsten diagnostizierte Endokrinopathie dar. In Abhängigkeit von der Hunderasse, dem Futter und der Jodversorgung wird eine Inzidenz der Hypothyreose zwischen 1 zu 156 bis 1 zu 500 angegeben (Chastain, 1995; Schaer, 2003). Von einer primären Hypothyreose betroffen sind vor allem Hunde mittleren Alters größerer Rassen, wobei hierbei von einem langsamen Krankheitsprozess ausgegangen wird, der sich über Jahre entwickelt. Nach Schaer (2003) gehören vor allem junge bis mittelalte Tiere der größeren Rassen, wie Golden Retriever, Dobermann und Irish Setter zum Kollektiv der Hypothyreose-Patienten. Die primäre Hypothyreose wird vermutlich durch eine immunbedingte lymphoplasmazelluläre Thyreoiditis verursacht und ähnelt damit der Autoimmunthyreoiditis Typ Hashimoto beim Menschen, allerdings offensichtlich mit einer sehr viel größeren Wahrscheinlichkeit des Übergangs in die atrophische Verlaufsform. Die Immunpathogenese der Erkrankung wird durch die Beobachtung gestützt, dass etwa 50% der hypothyreoten Hunde labordiagnostisch nachweisbare Antikörper gegen Thyreoglobulin aufweisen (Lee et al., 2004). Bei histologischen Untersuchungen von Schilddrüsenewebe hypothyreoten Hunde wird neben der lymphoplasmazellulären Thyreoiditis, bei der die Schilddrüse mit Makrophagen, Plasmazellen, Lymphozyten, Leukozyten und degenerierten Follikelzellen infiltriert ist, häufig auch eine idiopathische follikuläre Atrophie ohne deutliche Hinweise auf eine Ansammlung von Entzündungszellen bzw. Fibrose des Gewebes

festgestellt. Hierbei ist nicht klar, ob es sich dabei um ein Endstadium der lymphoplasmazellulären Thyreoiditis oder ein primäres Geschehen anderer Genese handelt (Mansfield und Mooney, 2006; Stockhaus, 2003)

Die sekundäre Hypothyreose durch TSH-Synthesedefekt ist beim Hund selten. Sie ist gewöhnlich assoziiert mit einem Tumor der Hypophyse, kann aber auch aufgrund einer kongenitalen Hypophyseninsuffizienz auftreten. Histologisch lässt sich eine Abflachung der Follikelepithelzellen, eine Ausweitung der Follikel durch das Kolloid und das Fehlen von Kolloidvakuolen feststellen (Schaer, 2003). Eine sekundäre Hypothyreose kann aus einer zystischen Rathke-Tasche, die die Hypophyse komprimiert, resultieren (Chastain, 1995). Hypophysärer Zwergwuchs aufgrund einer zystisch entarteten Rathke-Tasche ist beim Deutschen Schäferhund und beim Karelischen Bärenhund erblich.

Schaer (2003) gibt als Ursachen für die tertiäre Hypothyreose des Hundes eine Dysfunktion des Hypothalamus, Jodmangel und Defekte beim Transport der Schilddrüsenhormone im Serum an. Die tertiäre Hypothyreose, die gelegentlich beim Menschen auftritt, scheint beim Hund keine Bedeutung zu haben (Stockhaus, 2003).

Das klinische Bild der Hypothyreose resultiert vor allem aus der verminderten Stoffwechsel steigernden Wirkung der Schilddrüsenhormone auf die Gewebe. Daher sind die klinischen Symptome sehr mannigfaltig und zum Teil recht unspezifisch. Häufig zeigt das betroffene Tier Lethargie, Bradykardie, Gewichtszunahme ohne vermehrte Futteraufnahme, Kälteintoleranz und Hypothermie (Dixon et al., 1999; Martin et al., 2006; Panciera, 2001). Klinisch überwiegen jedoch bei der Hypothyreose des Hundes Haut- und Fellveränderungen, wie z.B. kutane Veränderungen in Form von bilateral symmetrischer Alopezie ohne Pruritus, die besonders an den Flanken, am Brustkorb und ventral am Rumpf lokalisiert ist (Frank, 2006). Zusätzlich kann eine Verdickung der Haut mit Hyperpigmentation auftreten (Nesbitt et al., 1980; Panciera, 1994). Je nach Arbeitsgebiet finden die verschiedenen Untersucher bei 70-85% (Nesbitt et al., 1980; Peterson und Ferguson, 1989) oder nur bei 60% (Chester, 1987) ihrer Patienten dermatologische Symptome. Der Verdacht drängt sich auf, dass dermatologisch interessierte Untersucher prozentual mehr Hypothyreosen mit dermatologischen Problemen sehen als internistisch orientierte Untersucher. Eine Geschlechtsprädisposition ist weder bei der primären noch bei der erworbenen Hypothyreose vorhanden. Auch Zyklusunregelmäßigkeiten bei Hündinnen, okuläre Symptome sowie gastrointestinale Störungen und blasse Schleimhäute werden im Zusammenhang mit einer Hypothyreose genannt (Schaer, 2003; Stockhaus, 2003). Die bei der Hypothyreose

entstehende hohe TRH-Ausschüttung und die niedrige Dopaminkonzentration im Hypothalamus führen zu einer erhöhten Prolaktinausschüttung (Drazner, 1987). Zumindest teilweise ist Hyperprolaktinämie für die verringerte Fertilität und Pseudograviditäten verantwortlich. Prolaktin interferiert mit den gonadotropen Releasing Hormonen oder direkt mit der Produktion steroidaler Hormone (Drazner, 1987). Chastain und Panciera empfehlen bei Verdacht einer Hypothyreose beim Hund initial die Bestimmung der Konzentration von TT_4 und freiem T_4 .

Die Diagnostik der Schilddrüsenfunktionsstörungen beim Hund war lange Zeit durch das Fehlen eines TSH-Assays erschwert. Beim Menschen gilt die TSH-Bestimmung als verlässlichster Parameter zur Beurteilung der Schilddrüsenstoffwechsellage, da die lineare Veränderung der Thyroxinspiegel mit einer umgekehrt exponentiellen Veränderung der TSH-Spiegel einhergeht, und somit nicht nur empfindlicher, sondern auch viel früher reagiert. Die auch beim Menschen früher übliche Beurteilung der Schilddrüsenfunktion nur anhand der Schilddrüsenhormonspiegel wird zusätzlich durch die Problematik der Schilddrüsenhormonbindungsproteine verschärft, die entweder die Bestimmung eines Parameters zur Beurteilung der freien Schilddrüsenhormonfraktion (fT_4 bzw. fT_3) oder die Bestimmung mindestens des wichtigsten Bindungsproteins, TBG, erfordert. Wie in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, exprimiert der Hund jedoch kein TBG, so dass die freien Thyroxinspiegel und die Gesamtthyroxinspiegel bei Mensch und Hund in einer ganz anderen Relation stehen (siehe Abbildungen 13, 14 und 15). Schon aus diesem Grund sind die Schilddrüsenhormonparameter des Hundes nicht mit denen des Menschen vergleichbar und erfordern die Etablierung unabhängiger Referenzwerte.

Beim Vergleich der Relation von TT_4 zu fT_4 bei Mensch und Hund (Abb. 13) zeigen die Paare beim Menschen eine erheblich größere Streuung, als dies von dem TRH-TSH-T₄-Regelkreis zu erwarten wäre (Demers und Spencer, 2003). Im Gegensatz zu einem Normalkollektiv handelt es sich bei den in dieser Arbeit verwandten Proben aus einem Universitäts-Krankenhaus, dessen Patienten zu einem erheblichen Anteil an schweren, nicht-thyreoidalen Erkrankungen leiden und Medikamenteninteraktionen sowie akuten Interventionen mit Schilddrüsenhormonen oder Thyreostatika ausgesetzt sind. Tatsächlich ist dieses Kollektiv aber viel besser zum Vergleich mit den Serumproben von den Hunden geeignet, da die Hunde ja auch zum überwiegenden Teil krank waren und nur so die ganze Bandbreite der TSH- TT_4 – fT_4 Werte untersucht werden konnte. Wie in Abbildung 14 und 15 dargestellt ergeben sich, trotz der durch den Regelkreis vorgegebenen Abhängigkeit von

TSH und T_4 , nur sehr schlechte Korrelations-Koeffizienten von $r^2=0,12$ für die Proben vom Menschen und $r^2=0,04$ für die vom Hund. Beim Mensch ist dies auch hier durch die Interaktionen mit Medikamenten und dem hohen Anteil schwer kranker Patienten in diesem Kollektiv zu erklären. Die noch schlechtere Korrelation beim Hund ist möglicherweise durch die schlechte Sensitivität des cTSH-Assays bedingt (Boretti und Reusch, 2004). Auch in Referenzkollektiven findet sich beim Menschen eine sehr viel bessere Korrelation zwischen TSH und Thyroxin als beim Hund (Boretti et al., 2006; Demers und Spencer, 2003).

Historisch wurde zunächst die Bestimmung des Gesamtthyroxins etabliert. T_4 ist eine sehr stabile Verbindung. Im Serum oder Plasma hält es sich bei Raumtemperatur etwa 8 Tage, so dass Proben zur Bestimmung auch per Post versandt werden können. Die T_4 -Konzentration im Plasma oder Serum ändert sich weder nach Kontakt mit Blutzellen, noch durch Hämolyse, durch Zentrifugieren, Tiefkühlung oder wiederholtes Auftauen (Reimers et al., 1982). Die Bereiche der basalen T_4 -Konzentration bei euthyreoten und hypothyreoten Hunden weisen jedoch eine Überlappung von 10 - 20% auf (Drazner, 1987). Da nicht-thyreoidale Erkrankungen, die zu einer Erniedrigung der TT_4 -Konzentration durch Veränderung der Bindungskapazität der Trägerproteine der Schilddrüsenhormone im Serum und zur Inhibition der TSH-Sekretion führt, den basalen T_4 -Wert beeinflussen können, sind alleinige T_4 -Wertbestimmungen zwangsläufig mit Fehldiagnosen verbunden (Daminet und Ferguson, 2003; Stockhaus, 2003). Daher kann durch die Bestimmung des freien T_4 das eventuelle Vorliegen einer nicht-thyreoidalen Erkrankung aufgezeigt werden (Stockhaus, 2003).

Larsson definierte mit einzelnen fT_4 - und Cholesterinbestimmungen den k-Wert der zusätzlich den Anstieg des Cholesterins bei der Hypothyreose berücksichtigt. 66-75% der hypothyreoten Patienten zeigen eine Hypercholesterinämie, die dadurch zustande kommt, dass trotz einer Beeinträchtigung der Cholesterinsynthese bei einer Hypothyreose, aufgrund der Verminderung der Lipolyse des Lipoproteins und einer Reduktion der low-density-Lipoprotein-Rezeptoren eine Erhöhung der low-density- und very-low-density-Lipoproteine im Blut resultiert. Daher sollte bei Vorliegen einer Hypercholesterinämie unbekannter Ursache eine Untersuchung der Schilddrüsenfunktion eingeleitet werden (Chastain, 1995; Kraft und Dietl, 1993).

Alle diese Assays haben jedoch nur eine begrenzte Aussagekraft, da sie nur die manifeste Hypothyreose sicher erkennen. Lange Jahre wurde daher an einem TSH-Assay für Hunde gearbeitet, um vergleichbar zur Humandiagnostik bereits eine latente Hypothyreose erkennen zu können und eine höhere Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Dies ist mit dem caninen

TSH (cTSH)-Assay versucht, aber leider nur zum Teil erreicht worden. So ist er nicht gegen Hunde-TSH gerichtet, sondern gegen das des Silberfuchses, welches sich molekularbiologisch gering von dem des Hundes unterscheidet. Boretti und Reusch zeigten in ihrer Studie anhand von 65 Hunden mit klinischen Symptomen einer Hypothyreose, dass die Bestimmung des cTSH zwar über eine exzellente Spezifität verfügt und einen wertvollen Parameter in der Diagnose der Hypothyreose darstellt, dieser jedoch aufgrund seiner niedrigen Sensitivität nicht zum Ausschluss einer Hypothyreose empfohlen werden kann (Boretti und Reusch, 2004; Panciera, 1999). Die Diagnostik ist besser, aber sicher immer noch nicht optimal, so dass weiterhin Scores unter Berücksichtigung anderer Parameter und auch der Klinik angewandt werden. Dabei unterscheiden sich die freien Thyroxinspiegel bei Mensch und Hund nicht wesentlich, nur die Gesamtthyroxinspiegel sind beim Hund wegen des Fehlens von TBG deutlich niedriger.

Die bei den meisten Säugetieren vorhandenen drei Bindungsproteine für Schilddrüsen-Hormone (Albumin, Transthyretin und Thyroxin-bindendes Globulin) stellen ein ausgeklügeltes Puffersystem zum langfristigen Erhalt einer normalen Schilddrüsenfunktion dar. Entwicklungsgeschichtlich ist Albumin das älteste Schilddrüsenhormon-Bindungsprotein, da es sich schon bei Reptilien und Fischen nachweisen lässt (Richardson et al., 2005). Es folgt Transthyretin (TTR), welches sich bei vielen niederen Tieren findet. Erst bei Säugetieren lässt sich Thyroxin-bindendes Globulin (TGB) nachweisen, welches wegen seiner extrem hohen Bindungsaffinität das wichtigste Bindungsprotein, und damit den größten Schilddrüsenhormon- und Jodspeicher bildet. TTR und Albumin dienen mit ihrer sehr viel geringeren Bindungsaffinität mehr der Umverteilung eines rasch verfügbaren Schilddrüsenhormon-Pools.

Wie beim Hund findet sich auch bei einigen anderen Säugetieren kein TBG. Eine Einteilung ist dabei nach dem Ernährungsverhalten möglich. Carnivoren, die mit ihrer Beute auch deren Schilddrüsen fressen, und daher offensichtlich weniger Schilddrüsenhormonspeicherkapazität brauchen, haben durchweg kein TBG: z.B. Braunbär, Wolf, Hund, Katze, Gepard, Tiger. Umgekehrt haben reine Herbivoren, die mit ihrem Futter kein Schilddrüsenhormon und nur geringe Mengen Jod aufnehmen, einen Bedarf an TBG als Langzeitspeicher, der besonders beim Elefanten eine extrem hohe Kapazität hat, sich aber auch bei Springbock, Antilope, Axishirsch, Pferd, Schaf, Rind und Ziege findet. Allerdings gibt es hier einige Ausnahmen, wie z.B. Wildesel und Elch, die ohne TBG auskommen. Primaten, die für ihre komplexen Handlungsabläufe und Lernsituationen ihr ganzes Leben eine sichere Versorgung mit

Schilddrüsenhormon brauchen, haben ebenfalls alle TBG. Umgekehrt haben Nagetiere nur in der Perinatalzeit und im Senium, bzw. bei schweren Hypothyreosen TBG im Blut (Vranckx et al., 1990a), möglicherweise ersparen sie sich damit im normalen Erwachsenenleben den Mehraufwand einer TBG-Synthese und der damit verbundenen höheren Syntheserate von Schilddrüsenhormon. Als Raubtier, dazu noch in einem sozialen Rudelwesen organisiert, ist beim Hund eine ausreichende Versorgung mit Schilddrüsenhormon gewährleistet, so dass TBG als Speicher nicht erforderlich ist.

Das Fehlen von TBG (engl. „complete deficiency“, TBG-CD) ist bei einer ganzen Reihe von menschlichen TBG-Varianten untersucht worden (Mannavola et al., 2006; Moeller et al., 2006). Die häufigste Ursache sind dabei Frameshift-Mutationen, die zu vorzeitigem oder verspätetem Abbruch der Synthese der Peptidkette des TBG führen (Abb. 26) (Moeller et al., 2006). Einzelne TBG-CD werden auch durch Punktmutationen ohne Frameshift (TBG-CD5 (Janssen und Refetoff, 1992)) oder durch RNA-Splicingdefekte (TBG-Kantakee (Carvalho et al., 1998); TBG-Jackson (Reutrakul et al., 2002) und TBG-Milano (Mannavola et al., 2006) verursacht. Beim Hund war jedoch die Sequenz und Struktur des TBG-Gens intakt, so dass Punktmutationen, Frameshifts oder RNA-Splicingdefekte nicht für das Fehlen von TBG beim Hund in Frage kamen.

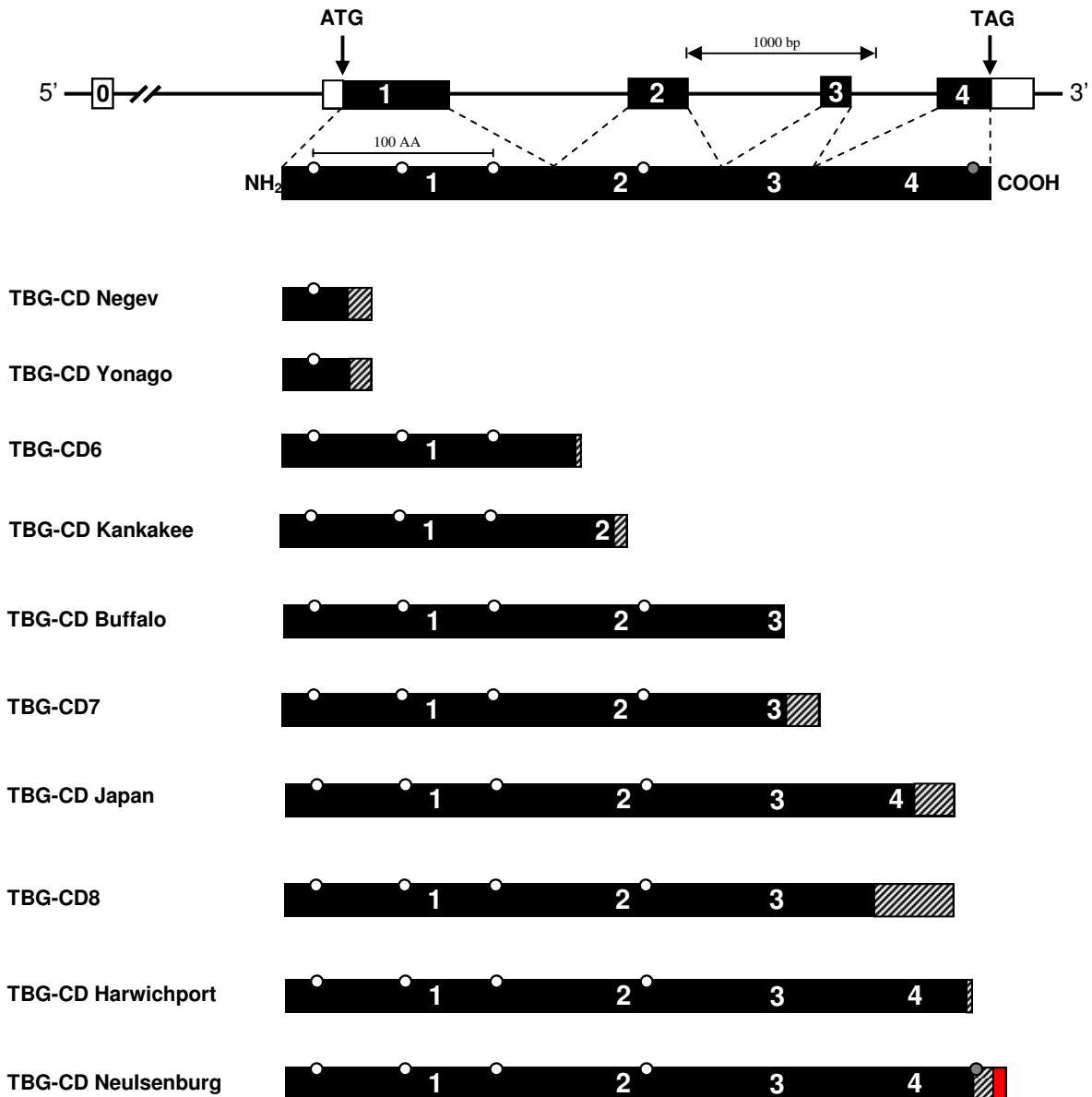


Abb. 26 Complete Deficiency Varianten des TBG durch Frameshift-Mutationen beim Menschen.

Gezeigt ist die Struktur der DNA und des Proteins. 5' und 3' kennzeichnen das 5'- und 3'-Ende der DNA; NH₂ das aminoternale und COOH das carboxyterminale Ende des Proteins. ATG kennzeichnet das Startcodon und TAG das Stoppcodon. Die Zahlen 0 bis 4 bezeichnen die Exons. Das Signalpeptid ist als weißer Kasten dargestellt. Die Glykosilierungsstellen sind als weiße Kreise gekennzeichnet. Als Maßstab sind Basenpaare (bp) und Aminosäuren (AA) angegeben. Die Länge der Balken der einzelnen TBG-Varianten kennzeichnet den Strangabbruch, der schraffierte Bereich davor die zusätzlich durch den Frameshift mutierten Aminosäuren. Bei TBG-CD-Neulsenburg kommt es zu einem verspäteten Strangabbruch, die zusätzlichen Aminosäuren sind rot dargestellt, adaptiert nach (Moeller et al., 2006).

Als wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit konnte als bisher unbekannte Ursache eines kompletten Fehlens von TBG ein Promotordefekt im TBG-Gen des Hundes identifiziert werden, und zwar im Bereich der Bindungsstelle des hepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1). Der menschliche TBG-Gen Promotor war 1993 eingehend charakterisiert worden (Hayashi et al., 1993). Mittels einer Serie von 5'-Deletionen wurde damals gezeigt, dass der Bereich bis -218 Basenpaare vor der Transkriptionsstartstelle (TSS) die höchste Promotoraktivität hat. Während sich mit dieser Promotorsequenz eine fast 1000-fache Aktivität in der Leberzelllinie HepG2 fand, war die Expression in den nicht von Leberzellen abstammenden Zelllinien CV-1 und CHO nur zehnmal höher als bei dem als Kontrolle eingesetzten Leervektor. Während ein Phorbol ester die Promotoraktivität um 80% reduzieren konnte, hatten Schilddrüsenhormon, Glucocorticoide, Östradiol und Nikotinsäure keinen Effekt auf die TBG-Expression. Die leberspezifische Expression findet sich dabei offenbar in der Region zwischen -218 und -102, da ein Promotorkonstrukt ab -101 vor der TSS keine Expression mehr in den HepG2, aber unveränderte Expression in CV-1 und CHO Zellen zeigte. In diesem Bereich liegen eine CTF/NF1 (CAAT transcription factor/nuclear factor-1) und drei HNF-3 (hepatocyte nuclear factor-3) Bindungsstellen. Andererseits führte die *in vitro* Zerstörung der an Position -65 liegenden HNF-1 Bindungsstelle durch gerichtete Mutagenese zum Verlust der Expression in allen Zelllinien. Ohne intakte HNF-1 Bindungsstelle ist also offenbar eine TBG-Expression beim Menschen nicht möglich.

Durch seine Zugehörigkeit zu der Superfamilie der Serin-Proteinase-Inhibitoren (Serpine) ist TBG mit α_1 -Antitrypsin (A1AT) verwandt (Huber und Carrell, 1989). Homolog zum TBG-Gen findet sich im Ratten-spezifischen A1AT-Gen an Position -52 vor der TSS ebenfalls eine HNF-1 Bindungsstelle, die gemeinsam mit einer HNF-2 Bindungsstelle an Position -100 die leberspezifische Expression von A1AT reguliert (Li et al., 1988).

Im Promotorbereich des mit dem TBG ebenfalls verwandten Corticosteroid-bindenden Globulins (CBG) fanden Zhao et al. im CBG-Gen der Ratte je eine Bindungsstelle für HNF-1 β (hepatocyte nuclear factor-1 β) und für CTF/NF-1 im Bereich ab -145 vor der TSS (Zhao et al., 1997). Mutationen in der HNF-1 β Bindungsstelle hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Promotoraktivität, während die Zerstörung der CTF/NF-1 Bindungsstelle die Transkription komplett verhinderte. Die Expression von CBG wird beim Menschen und anderen Säugetieren (Ratte, Schwein, Pavian, Schaf) darüber hinaus von verschiedenen Hormonen, Umweltfaktoren und dem Entwicklungsstand reguliert (Cole et al., 1999;

Elfahime et al., 1996; Heo et al., 2003; Pepe et al., 1996; Seralini, 1996; Smith und Hammond, 1992; Wang et al., 1997).

Die Expression des TTR, das nicht zu den Serpinen gehört, ist mindestens genauso komplex reguliert wie die des TBG (Costa et al., 1989). Im proximalen TTR-Promotor findet sich eine für die Expression essentielle C/EBP (CCAAT-enhancer binding protein)-Bindungsstelle. Weiter distal finden sich zwei HNF-3 Bindungsstellen ähnlich dem TBG-Promotor, zusätzlich jedoch noch zwei HNF-4 Bindungsstellen, die zusammen die leberspezifische Expression regulieren.

Bei verschiedenen Genen sind Mutationen in der HNF-1 Bindungsstelle beschrieben worden. So führt eine T → C Transition an Position 9 der HNF-1 Bindungsstelle im Protein C-Promotor zu Protein C-Mangel und rezidivierenden venösen Thrombosen (Berg et al., 1994). Die einzelne Punktmutation, die der A → G Substitution in der HNF-1 Bindungsstelle der Ratte oder Maus im TBG-Promotor entspricht, verursachte einen fast vollständigen Aktivitätsverlust. Später zeigten Spek et al., dass sich die HNF-1 Bindungsstelle komplett mit einer HNF-6 Bindungsstelle überlappt und letztere die positive Regulation übernimmt, während HNF-1 eine atypische, negative Regulation im Promotor des Protein C-Gens übernimmt (Spek et al., 1998). Offensichtlich ist also nicht die Anzahl, sondern die Art und der Kontext der Mutation einer HNF-1 Bindungsstelle entscheidend für das Ausmaß des Aktivitätsverlustes des Promotors.

Beim Streifenhörnchen reguliert HNF-1 die leberspezifische Transkription des Winterschlaf-spezifischen Proteins (hibernation-specific protein) HP-20, wie Ono et al. im Gel-Shift-Assay mit Anti-HNF-1 Antikörpern und im Luciferase-Assay mit mutierter HNF-1 Bindungsstelle zeigen konnten (Ono et al., 2001).

In einer Nierenzelllinie fand sich, dass die Expression der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK-C) als Schlüsselenzym der Gluko- und Glycerinneogenese von einer intakten HNF-1 Bindungsstelle abhängt (Cassuto et al., 1997). Mit transgenen Mäusen konnte später demonstriert werden, dass die direkte Umgebung der HNF-1 Bindungsstelle, nicht jedoch die weiter distal liegende Glucocorticoid-Rezeptor Response Einheit für die Azidose-induzierte Steigerung der PEPCK-C Expression in der Niere verantwortlich ist (Cassuto et al., 2003).

Der Defekt in der HNF-1 Bindungsstelle des TBG-Promotors ist also eine plausible Erklärung der mangelnden TBG-Synthese beim Hund, die durch Expression entsprechender

Promotorkonstrukte im Luciferase-Assay bestätigt werden konnte. Eine räumliche Darstellung der Lage der Mutationen in der Mitte der HNF-1 Bindungsstelle und ihrer Interaktion mit einem HNF-1 Protein-Dimer verdeutlicht den Defekt (Abb. 27).

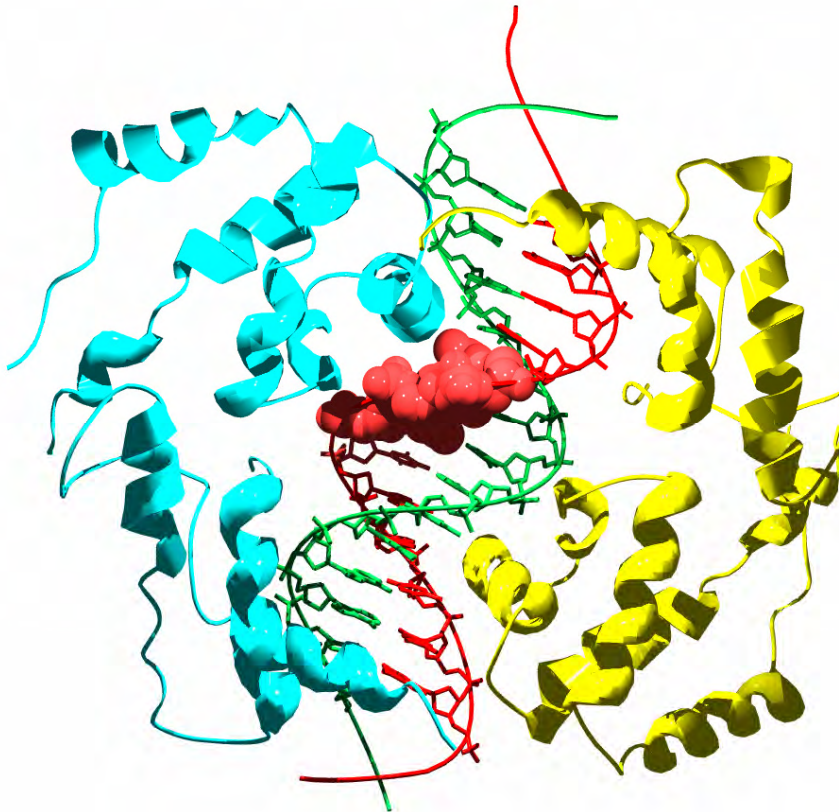
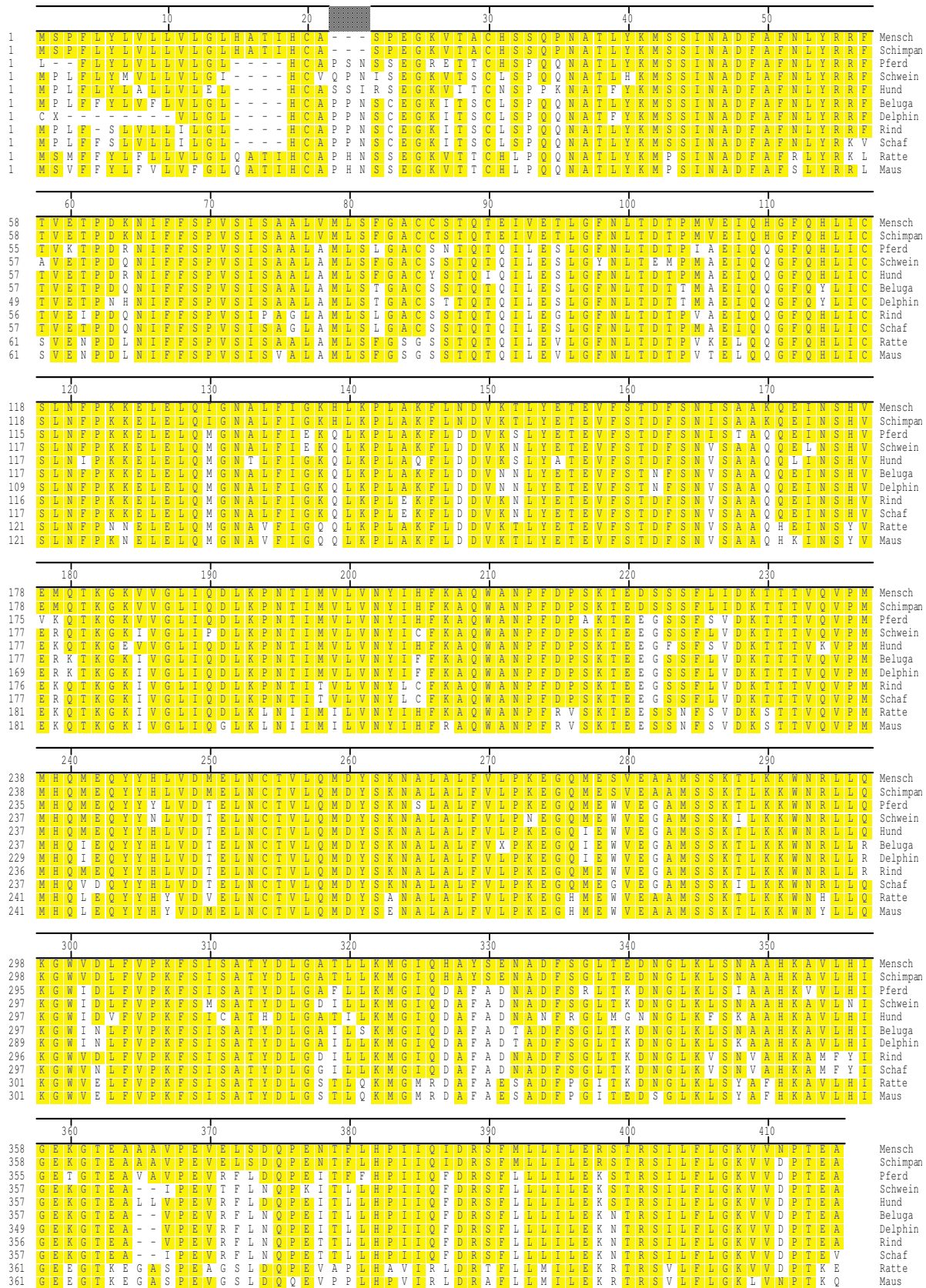


Abb. 27 Strukturmodell der HNF-1 Bindungsstelle mit angelagertem HNF-1 α Dimer.

Der sense-Strang der DNA ist rot, der antisense-Strang grün, die beiden HNF-1 α Moleküle sind blau und gelb dargestellt. Die drei Nukleotidsubstitutionen der HNF-1 Bindungsstelle liegen direkt in der Mitte des Komplexes und interferieren so mit der Bindung des HNF-1 α -Dimers (modifiziert nach Chi et al., 2002).

Die Mutation der HNF-1-Bindungsstelle beim Hund zerstört dessen Funktion komplett, der einzelne Nukleotidaustausch in der HNF-1-Bindungsstelle bei der Maus im Vergleich zum Menschen reduziert die leberspezifische TBG-Expression jedoch nur unwesentlich, das Fehlen von TBG bei den adulten Mäusen muss also eine andere Ursachen haben.

Bei der Suche nach der Ursache des Fehlens von TBG beim Hund wurde auch das Hunde-TBG-Gen sequenziert und seine Aminosäuresequenz bestimmt (Abb. 18). Im Vergleich mit den anderen bekannten TBG-Sequenzen fand sich erwartungsgemäß eine hohe Homologie (Abb. 28 und Tab. 3), die eine Einordnung des Hunde TBG in den Stammbaum der Säugetiere ermöglichte (Abb. 29). Dabei finden sich die erwarteten Verwandtschaften mit Paarbildung von Mensch und Schimpanse, Belugawal und Delphin, Rind und Schaf sowie Ratte und Maus. Auffällig ist die schon von anderen Sequenzvergleichen und mitochondrialem DNA-Vergleich abgeleitete Verwandtschaft der Cetacea (Wale, hier Belugawal und Delphin) mit den Artiodactyla (Paarhufer, Rind und Schaf), so dass heute davon ausgegangen wird, dass die Cetacea phylogenetisch wieder in das Meer zurückgekehrte Artiodactyla darstellen (Graur und Higgins, 1994; Milinkovitch et al., 1993). Eine genauere phylogenetische Zuordnung des Hunde-TBG oder des Pferde-TBG ist mit den bisher erhobenen Daten nicht möglich; bei allen TBG-Sequenzen ist jedoch insgesamt die überdurchschnittlich hohe Homologie im Vergleich zu anderen Serin-Protease-Inhibitoren auffällig (van Gent et al., 2003).



Decoration *Decoration #4*: Shade (with solid bright yellow) residues that match Mensch exactly.

Abb. 28 Alignment aller TBG-Aminosäuresequenzen. Gelb unterlegte Abschnitte sind mit der humanen TBG Sequenz identisch.

Tab. 3 Homologievergleich bekannter TBGs.

Aminosäurehomologie in %

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	█	99.8	85.6	83.7	82.5	84.4	84.1	84.1	82.9	76.9	76.4	1	Mensch
2	0.2	█	85.9	83.9	82.8	84.6	84.3	84.4	83.2	77.2	76.2	2	Schimpanse
3	16.0	15.7	█	87.8	86.9	88.6	88.9	88.0	86.4	78.2	76.5	3	Pferd
4	18.5	18.2	13.3	█	85.0	90.1	89.4	89.6	89.3	76.3	74.6	4	Schwein
5	20.0	19.6	14.4	16.8	█	86.0	86.4	84.7	83.3	74.7	73.5	5	Hund
6	17.6	17.2	12.4	10.7	15.6	█	97.8	92.0	91.5	78.0	76.5	6	Beluga
7	17.9	17.6	12.1	11.5	15.0	2.3	█	91.1	90.6	77.5	76.0	7	Delphin
8	17.9	17.6	13.1	11.3	17.1	8.5	9.5	█	96.1	77.7	76.0	8	Rind
9	19.4	19.1	15.1	11.5	19.0	9.0	10.0	4.0	█	77.2	75.1	9	Schaf
10	27.6	27.3	25.8	28.6	30.9	26.1	26.8	26.6	27.2	█	94.3	10	Ratte
11	28.3	28.7	28.2	31.1	32.7	28.2	28.9	29.0	30.4	6.0	█	11	Maus
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

Aminosäuredivergenz in %

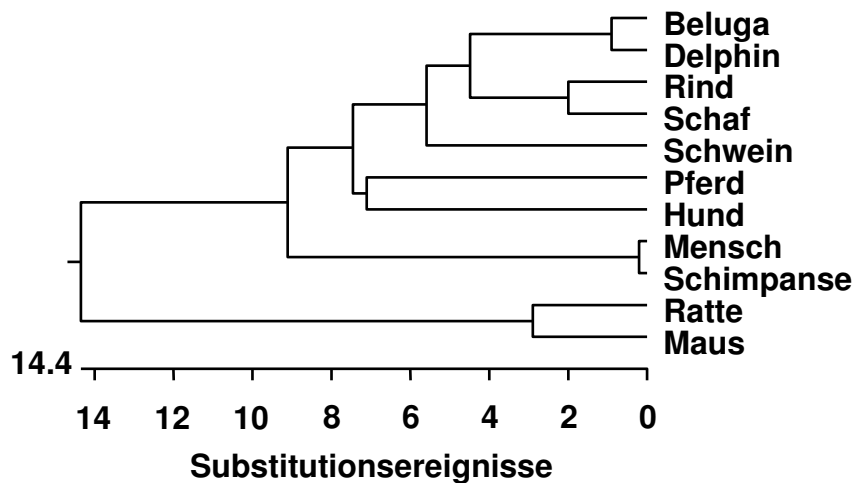


Abb. 29 Stammbaum des TBG.

Die Abszisse gibt als Maß des Verwandtschaftsgrades die Anzahl der Aminosäuresubstitutionen an. Die Knotenpunkte kennzeichnen Vorläuferproteine, bei denen eine entwicklungsgeschichtliche Trennung der Rassen stattfand.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Schilddrüsenfunktion des Hundes charakterisiert und erstmals die Ursache für das Fehlen von Thyroxin-bindendem Globulin (TBG) beim Hund mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen. In einer retrospektiven Analyse wurde gezeigt, dass das Verhältnis der freien zu totalen Thyroxinspiegel in Hundeseren mit 1:1200 deutlich höher lag als in menschlichen Seren mit 1:6400. Als Erklärung für die geringere Schilddrüsenhormonbindungskapazität beim Hund wurde mittels eines spezifischen T₄-Bindungstests nachgewiesen, dass der Hund kein TBG exprimiert. Bei der Untersuchung des TBG-Gens vom Hund fanden sich keine offensichtlichen, die Synthese oder die Sekretion beeinträchtigenden Mutationen oder Frameshifts in der cDNA oder in der Aminosäuresequenz des Hunde-TBG. Allerdings fand sich im mitsequenzierten Promotorbereich, 68 Basenpaare vor der Transkriptionsstartstelle im Vergleich zur Sequenz des menschlichen TBG-Promotors eine Substitution von drei Basenpaaren TTA → GAG in der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors HNF-1 (hepatocyte nuclear factor-1). Im Luciferaseassay konnte gezeigt werden, dass die drei Nukleotidsubstitutionen beim Hund keine nennenswerte Promotoraktivierung zulassen. Im Vergleich dazu zeigte die Mäuse-TBG-Promotor Sequenz, die nur eine Mutation in der HNF-1 Bindungsstelle hat, eine genauso gute Aktivierung des TBG-Promotors wie die HNF-1 Bindungsstelle vom Menschen. Als Ursache des Fehlens von TBG beim Hund konnte somit ein Defekt in der HNF-1 Bindungsstelle im Promotor des TBG Gens nachgewiesen werden. Nebenbefundlich konnte das TBG des Hundes, obwohl es nicht exprimiert wird, anhand seiner cDNA- und Aminosäuresequenz in den Stammbaum der Säugetier-TBGs aufgenommen werden.

7 Summary

In the present dissertation the dog thyroid function was characterized and, for the first time, the reason for total thyroxin-binding globulin (TBG) deficiency in dogs was determined by molecular methods. In a retrospect analysis of dog sera, their free to total thyroxin (T₄) ratio was found to be much higher (1:1200) than in human sera (1:6400). With a specific T₄-binding assay, complete TBG-deficiency was found to be the cause of lower thyroxine binding capacity in dogs. Sequencing of the dog TBG gene revealed no obvious mutations or frameshifts in the cDNA or amino acid sequence to explain the complete TBG deficiency. However, compared to the human TBG-promoter, a three base pair substitution TTA→ GAG was found in the hepatocyte nuclear factor-1 binding site (HNF-1) 68 base pairs 5' of the transcription start site. Expression of promoter constructs in a luciferase assay verified that the three nucleotide substitution in the dog HNF-1 binding site completely abolished transcription. In comparison, the mouse TBG promoter, which contains a HNF-1 binding site with only one mutation, had the same transcriptional activity as the human HNF-1 binding site. Thus, a defect in the dog HNF-1 binding site in the canine TBG promoter was found to cause this complete TBG deficiency. In addition, canine TBG, although not expressed, could be incorporated into the phylogenetic tree of mammalian TBGs.

8 Literaturverzeichnis

- Ain, K.B., Mori, Y. und Refetoff, S., 1987, Reduced clearance rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation: a mechanism for estrogen-induced elevation of serum TBG concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 65, 689-696.
- Ain, K.B. und Refetoff, S., 1988, Relationship of oligosaccharide modification to the cause of serum thyroxine-binding globulin excess. *J Clin Endocrinol Metab* 66, 1037-1043.
- Ashwell, G. und Harford, J., 1982, Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 51, 531-554.
- Bamberg, E., 1987, Endokrinum, In: Scheunert, A., Trautmann, A. (Ed.) *Lehrbuch der Veterinärphysiologie*. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, pp. 455-457.
- Barber, P.J. und Elliott, J., 1996, Study of calcium homeostasis in feline hyperthyroidism. *J Small Anim Pract* 37, 575-582.
- Barr, S.C., 1985, Pituitary tumour causing multiple endocrinopathies in a dog. *Aust Vet J* 62, 127-129.
- Bellabarba, D., Inada, M., Varsano-Aharon, N. und Sterling, K., 1968, Thyroxine transport and turnover in major nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab* 28, 1023-1030.
- Belshaw, B.E., 1983, Thyroid diseases, In: Ettinger, S.J. (Ed.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 1592-1614.
- Belshaw, B.E., Barandes, M., Becker, D.V. und Berman, M., 1974, A model of iodine kinetics in the dog. *Endocrinology* 95, 1078-1093.
- Belshaw, B.E., Cooper, T.B. und Becker, D.V., 1975, The iodine requirement and influence of iodine intake on iodine metabolism and thyroid function in the adult beagle. *Endocrinology* 96, 1280-1291.
- Berg, L.P., Scopes, D.A., Alhaq, A., Kakkar, V.V. und Cooper, D.N., 1994, Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 1 in the protein C gene promoter is associated with hereditary thrombophilia. *Hum Mol Genet* 3, 2147-2152.
- Berson, S.A. und Yalow, R.S., 1991, Radiometrische Verfahren, In: Friemel, H. (Ed.) *Immunologische Arbeitsmethoden*. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 120-134.
- Bezzola, P., 2002, Thyroid carcinoma and hyperthyroidism in a dog. *Can Vet J* 43, 125-126.
- Bhat, M.K. und Cama, H.R., 1978, Vitamin A and thyroxine carrier proteins in chicken plasma: steady-state control of the plasma level of free retinol-binding protein and free thyroxine. *Biochim Biophys Acta* 541, 199-210.
- Blange, I., Drvota, V., Yen, P.M. und Sylven, C., 1997, Species differences in cardiac thyroid hormone receptor isoforms protein abundance. *Biol Pharm Bull* 20, 1123-1126.
- Böhme, G., 1992, Endokrine Drüsen, Glandulae sine ductibus, In: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (Ed.) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Band IV. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, pp. 473-501.
- Boretti, F.S. und Reusch, C.E., 2004, Endogenous TSH in the diagnosis of hypothyroidism in dogs. *Schweiz Arch Tierheilkunde* 146, 183-188.
- Boretti, F.S., Sieber-Ruckstuhl, N.S., Favrot, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. und Reusch, C.E., 2006, Evaluation of recombinant human thyroid-stimulating hormone to test thyroid function in dogs suspected of having hypothyroidism. *Am J Vet Res* 67, 2012-2016.
- Broussard, J.D., Peterson, M.E. und Fox, P.R., 1995, Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993. *J Am Vet Med Assoc* 206, 302-305.
- Bruchim, Y., Kushnir, A. und Shamir, M.H., 2005, L-thyroxine responsive cricopharyngeal achalasia associated with hypothyroidism in a dog. *J Small Anim Pract* 46, 553-554.

- Budsberg, S.C., Moore, G.E. und Klappenbach, K., 1993, Thyroxine-responsive unilateral forelimb lameness and generalized neuromuscular disease in four hypothyroid dogs. *J Am Vet Med Assoc* 202, 1859-1860.
- Burr, W.A., Ramsden, D.B. und Hoffenberg, R., 1980, Hereditary abnormalities of thyroxine-binding globulin concentration. A study of 19 kindreds with inherited increase or decrease of thyroxine-binding globulin. *Q J Med* 49, 295-313.
- Carvalho, G.A., Weiss, R.E. und Refetoff, S., 1998, Complete thyroxine-binding globulin (TBG) deficiency produced by a mutation in acceptor splice site causing frameshift and early termination of translation (TBG-Kankakee). *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3604-3608.
- Cassuto, H., Olswang, Y., Heinemann, S., Sabbagh, K., Hanson, R.W. und Reshef, L., 2003, The transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in the kidney requires the HNF-1 binding site of the gene. *Gene* 318, 177-184.
- Cassuto, H., Olswang, Y., Livoff, A.F., Nechushtan, H., Hanson, R.W. und Reshef, L., 1997, Involvement of HNF-1 in the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in the kidney. *FEBS Lett* 412, 597-602.
- Chastain, C.B., McNeel, S.V., Graham, C.L. und Pezzanite, S.C., 1983, Congenital hypothyroidism in a dog due to an iodide organification defect. *Am J Vet Res* 44, 1257-1265.
- Chastain, C.B., Panciera, D.L., 1995, Hypothyroid Diseases, In: Ettinger, S.J. (Ed.) *Textbook of Internal Medicine*. Saunders, Philadelphia, pp. 1487-1501.
- Cheng, S., Morrone, S. und Robbins, J., 1979, Effect of deglycosylation on the binding and immunoreactivity of human thyroxine-binding globulin. *J Biol Chem* 254, 8830-8835.
- Chester, D.K., 1987, The thyroid gland and thyroid disease, In: Drazner, H. (Ed.) *Small animal endocrinology*. Churchill Livingstone, New York, pp. 83-120.
- Cole, T.J., Harris, H.J., Hoong, I., Solomon, N., Smith, R., Krozowski, Z. und Fullerton, M.J., 1999, The glucocorticoid receptor is essential for maintaining basal and dexamethasone-induced repression of the murine corticosteroid-binding globulin gene. *Mol Cell Endocrinol* 154, 29-36.
- Costa, R.H., Grayson, D.R. und Darnell, J.E., Jr., 1989, Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* 9, 1415-1425.
- Credille, K.M., Slater, M.R., Moriello, K.A., Nachreiner, R.F., Tucker, K.A. und Dunstan, R.W., 2001, The effects of thyroid hormones on the skin of beagle dogs. *J Vet Intern Med* 15, 539-546.
- Daminct, S., Croubels, S., Duchateau, L., Debunne, A., van Geffen, C., Hoybergs, Y., van Bree, H. und de Rick, A., 2003, Influence of acetylsalicylic acid and ketoprofen on canine thyroid function tests. *Vet J* 166, 224-232.
- Daminct, S. und Ferguson, D.C., 2003, Influence of drugs on thyroid function in dogs. *J Vet Intern Med* 17, 463-472.
- Demers, L.M. und Spencer, C.A., 2003, Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58, 138-140.
- Divino, C.M. und Schussler, G.C., 1990, Transthyretin receptors on human astrocytoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 71, 1265-1268.
- Dixon, R.M., Reid, S.W. und Mooney, C.T., 1999, Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Vet Rec* 145, 481-487.
- Dixon, R.M., Reid, S.W. und Mooney, C.T., 2002, Treatment and therapeutic monitoring of canine hypothyroidism. *J Small Anim Pract* 43, 334-340.
- Döcke, F., 1994, *Veterinärmedizinische Endokrinologie*, 3 Edition. Gustav Fischer Verlag.

- Drazner, F.H., 1987, Small animal endocrinology, 1 Edition New York, Edinburgh, London, 135-173 pp.
- Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.C., 1991, Die endokrinen Drüsen, In: Anatomie der Haustiere. Ferdinand Enke Verlag, pp. 233-235.
- Ekins, R.P., Sinha, A.K., Pickard, M.R., Evans, I.M. und al Yatama, F., 1994, Transport of thyroid hormones to target tissues. *Acta Med Austriaca* 21, 26-34.
- Elfahime, E., Felix, J.M. und Koch, B., 1996, Regulation of corticosteroid-binding globulin synthesis by 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ (calcitriol), 9-cis-retinoic acid and triiodothyronine in cultured rat fetal hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57, 109-115.
- Emerson, C.H., Seiler, C.M., Alex, S., Fang, S.L., Mori, Y. und DeVito, W.J., 1993, Gene expression and serum thyroxine-binding globulin are regulated by adrenal status and corticosterone in the rat. *Endocrinology* 133, 1192-1196.
- Evans, H.E., 1993, The Endocrine System, In: Evans, H.E. (Ed.) Miller's anatomy of the dog. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, pp. 611-615.
- Feldman, E.C., Nelson, R.W., 1996, Hypothyroidism, In: Feldman, E.C., Nelson, R.W. (Ed.) Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. und Danielsen, M., 1987, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417.
- Ferguson, D.C., 1984, Thyroid function tests in the dog. Recent concepts. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 14, 783-808.
- Ferguson, D.C., 1994, Update on diagnosis of canine hypothyroidism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 24, 515-539.
- Ferguson, D.C., 1996. Nonthyroidal illness and drug effects on thyroid function tests: should we pay attention? In: 14th ACVIM Forum, San Antonio.
- Ferguson, D.C. und Peterson, M.E., 1992, Serum free and total iodothyronine concentrations in dogs with hyperadrenocorticism. *Am J Vet Res* 53, 1636-1640.
- Flink, I.L., Bailey, T.J., Gustafson, T.A., Markham, B.E. und Morkin, E., 1986, Complete amino acid sequence of human thyroxine-binding globulin deduced from cloned DNA: close homology to the serine antiproteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7708-7712.
- Forth, W., 2001, Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8 Edition. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 721-730 pp.
- Fraley, R., Subramani, S., Berg, P. und Papahadjopoulos, D., 1980, Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J Biol Chem* 255, 10431-10435.
- Frank, L.A., 2006, Comparative dermatology--canine endocrine dermatoses. *Clin Dermatol* 24, 317-325.
- Frank, L.A., Hnilica, K.A., May, E.R., Sargent, S.J. und Davis, J.A., 2005, Effects of sulfamethoxazole-trimethoprim on thyroid function in dogs. *Am J Vet Res* 66, 256-259.
- Fugazzola, L., Cerutti, N., Mannavola, D., Vannucchi, G. und Beck-Peccoz, P., 2001, The role of pendrin in iodide regulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109, 18-22.
- Fujita, H. und Murakami, T., 1974, Scanning electron microscopy on the distribution of the minute blood vessels in the thyroid gland of the dog, rat and rhesus monkey. *Arch Histol Jpn* 36, 181-188.
- Furth, E.D., Becker, D.V., Nunez, E.A. und Reid, C.F., 1968, Thyroxine metabolism in the dog. *Endocrinology* 82, 976-982.

- Gartner, R., Henze, R., Horn, K., Pickardt, C.R. und Scriba, P.C., 1981, Thyroxine-binding globulin: investigation of microheterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 52, 657-664.
- Gershengorn, M.C., Cheng, S.Y., Lippoldt, R.E., Lord, R.S. und Robbins, J., 1977, Characterization of human thyroxine-binding globulin. Evidence for a single polypeptide chain. *J Biol Chem* 252, 8713-8718.
- Ginn, S.R. und Vilensky, J.A., 2006, Experimental confirmation by sir victor horsley of the relationship between thyroid gland dysfunction and myxedema. *Thyroid* 16, 743-747.
- Glennemeier, K.A. und Licht, P., 1993, Comparative studies of thyroxine binding proteins in turtle plasma using column chromatography. *Gen Comp Endocrinol* 89, 119-131.
- Gosselin, S.J., Capen, C.C. und Martin, S.L., 1981, Histologic and ultrastructural evaluation of thyroid lesions associated with hypothyroidism in dogs. *Vet Pathol* 18, 299-309.
- Gosselin, S.J., Capen, C.C., Martin, S.L. und Targowski, S.P., 1980, Biochemical and immunological investigations on hypothyroidism in dogs. *Can J Comp Med* 44, 158-168.
- Goussis, O.S. und Theodoropoulos, T.J., 1990, Dilantin and salicylate effects on hepatic thyroxine bio-availability and dialyzable thyroxine. *Horm Metab Res* 22, 342-344.
- Graham, F.L. und van der Eb, A.J., 1973, Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-539.
- Grau, H., 1943, Organe mit innerer Sekretion (Inkretion), Organa endocrinonta (endokrine Organe). In: Ellenberger, B. (Ed.) *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere*. Springer Verlag, Berlin, pp. 594-608.
- Graur, D. und Higgins, D.G., 1994, Molecular evidence for the inclusion of cetaceans within the order Artiodactyla. *Mol Biol Evol* 11, 357-364.
- Greco, D.S., Feldman, E.C., Peterson, M.E., Turner, J.L., Hodges, C.M. und Shipman, L.W., 1991, Congenital hypothyroid dwarfism in a family of giant schnauzers. *J Vet Intern Med* 5, 57-65.
- Greco, D.S., Peterson, M.E., Cho, D.Y. und Markovits, J.E., 1985, Juvenile-onset hypothyroidism in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 187, 948-950.
- Grubor, B. und Haynes, J.S., 2005, Thyroid carcinosarcoma in a dog. *Vet Pathol* 42, 84-87.
- Gulikers, K.P. und Panciera, D.L., 2003, Evaluation of the effects of clomipramine on canine thyroid function tests. *J Vet Intern Med* 17, 44-49.
- Hansen, S.R., Timmons, S.P. und Dorman, D.C., 1992, Acute overdose of levothyroxine in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 200, 1512-1514.
- Hayashi, Y., Mori, Y., Janssen, O.E., Sunthornthepvarakul, T., Weiss, R.E., Takeda, K., Weinberg, M., Seo, H., Bell, G.I. und Refetoff, S., 1993, Human thyroxine-binding globulin gene: complete sequence and transcriptional regulation. *Mol Endocrinol* 7, 1049-1060.
- Heller, O., 1932, Beitrag zur makroskopischen Anatomie der Schilddrüse von Hund und Katze, insbesondere zur Kenntnis der Maß- und Gewichtsverhältnisse und des Isthmus. *Gegenbauers Morphol Jahrbuch* 70, 364-393.
- Heo, J., Kattesh, H.G., Roberts, M.P. und Schneider, J.F., 2003, Plasma levels of cortisol and corticosteroid-binding globulin (CBG) and hepatic CBG mRNA expression in pre- and postnatal pigs. *Domest Anim Endocrinol* 25, 263-273.
- Higgins, M.A., Rossmeisl, J.H., Jr. und Panciera, D.L., 2006, Hypothyroid-associated central vestibular disease in 10 dogs: 1999-2005. *J Vet Intern Med* 20, 1363-1369.
- Hillier, A.P., 1971, The mechanism of thyroxine transfer from plasma to tissue binding sites. *J Physiol* 217, 635-639.
- Huber, R. und Carrell, R.W., 1989, Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* 28, 8951-8966.

- Hullinger, R., 1993, The Endocrine System, In: Evans, H. (Ed.) Miller's Anatomy of the Dog. WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 559-585.
- Imamura, S., Mori, Y., Murata, Y., Yamamori, I., Miura, Y., Oiso, Y., Seo, H., Matsui, N. und Refetoff, S., 1991, Molecular cloning and primary structure of rat thyroxine-binding globulin. *Biochemistry* 30, 5406-5411.
- Isojarvi, J.I., Pakarinen, A.J. und Myllyla, V.V., 1989, Thyroid function in epileptic patients treated with carbamazepine. *Arch Neurol* 46, 1175-1178.
- Jaggy, A. und Oliver, J.E., 1994, Neurologic manifestations of thyroid disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 24, 487-494.
- Jaggy, A., Oliver, J.E., Ferguson, D.C., Mahaffey, E.A. und Glaus, T., Jr., 1994, Neurological manifestations of hypothyroidism: a retrospective study of 29 dogs. *J Vet Intern Med* 8, 328-336.
- Jameson, J.L., 1998, Principles of Molecular Medicine, Humana Press, Totowa.
- Janssen, O.E., 1998, Resistenz gegen Schilddrüsenhormone. *Internist (Berl)* 39, 613-618.
- Janssen, O.E., Lahner, H., Grasberger, H., Spring, S.A., Saller, B., Mann, K., Refetoff, S. und Einspanier, R., 2002, Characterization and primary structures of bovine and porcine thyroxine-binding globulin. *Mol Cell Endocrinol* 186, 27-35.
- Janssen, O.E. und Refetoff, S., 1992, In vitro expression of thyroxine-binding globulin (TBG) variants. Impaired secretion of TBGPRO-227 but not TBGPRO-113. *J Biol Chem* 267, 13998-14004.
- Janssen, O.E., Takeda, K. und Refetoff, S., 1991, Sequence of the variant thyroxine-binding globulin (TBG) in a Montreal family with partial TBG deficiency. *Hum Genet* 87, 119-122.
- Jones, I., Srinivas, M., Ng, L. und Forrest, D., 2003, The thyroid hormone receptor beta gene: structure and functions in the brain and sensory systems. *Thyroid* 13, 1057-1068.
- Kambe, F., Seo, H., Murata, Y. und Matsui, N., 1988, Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid coding for human thyroxine-binding globulin (TBG): existence of two TBG messenger ribonucleic acid species possessing different 3'-untranslated regions. *Mol Endocrinol* 2, 181-185.
- Kemppainen, R.J. und Clark, T.P., 1994, Etiopathogenesis of canine hypothyroidism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 24, 467-476.
- Kienle, R.D., Bruyette, D. und Pion, P.D., 1994, Effects of thyroid hormone and thyroid dysfunction on the cardiovascular system. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 24, 495-507.
- Kienzle, E.H., D.C., 1997, Fehlerhafte Nährstoffversorgung: Die Bedeutung einer ausgewogenen Fütterung. In: Wills, J.M., Simpson, K.W. (Ed.) Das Waltham Buch der Klinischen Diätetik von Hund und Katze. Arcis-Verlag, München.
- Köhrle, J. und Petrides, P.E., 2007, Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenhormonachse, In: Löffler, G., Petrides, P.E. und Heinrich, P.C. (Eds.) Biochemie & Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, pp. 847-861.
- Kraft, W., 2000, Schilddrüsenkrankheiten, In: Kraft, W., Hirschberger, J. (Ed.) Kleintierkrankheiten, Innere Medizin. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 781-806.
- Kraft, W. und Dietl, A., 1993, [The diagnosis of hypothyroidism in dogs with Larsson's FT4-cholesterol test]. *Tierarztl Prax* 21, 567-573.
- Kraft, W. und Dietl, A., 1994, [Total thyroxine (T4) and free thyroxine (FT4) in hypothyroidism and nonthyroid diseases of dogs]. *Tierarztl Prax* 22, 472-479.
- Kraft, W., Reusch, C., 1990, Endokrine Organe, In: Kraft, W. (Ed.) Kleintierkrankheiten Band I Innere Medizin. Ulmer Verlag, Stuttgart, pp. 469-507.
- Kunkel, S., 1991, Radiometrische Verfahren, In: Friemel, H. (Ed.) Immunologische Arbeitsmethoden. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 120-134.

- Kwieceński, G.G., Damassa, D.A. und Gustafson, A.W., 1991, Patterns of plasma sex hormone-binding globulin, thyroxine and thyroxine-binding globulin in relation to reproductive state and hibernation in female little brown bats. *J Endocrinol* 128, 63-70.
- Larsson, M. und Pettersson, T., 1987, Purification and partial characterization of thyroid hormone binding proteins in canine serum. *Domest Anim Endocrinol* 4, 215-229.
- Larsson, M., Pettersson, T. und Carlstrom, A., 1985, Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs. *Gen Comp Endocrinol* 58, 360-375.
- Lawler, D.F., Ballam, J.M., Meadows, R., Larson, B.T., Li, Q., Stowe, H.D. und Kealy, R.D., 2006, Influence of lifetime food restriction on physiological variables in Labrador retriever dogs. *Exp Gerontol*.
- Leav, I., Schiller, A.L., Rijnberk, A., Legg, M.A. und der Kinderen, P.J., 1976, Adenomas and carcinomas of the canine and feline thyroid. *Am J Pathol* 83, 61-122.
- Lee, J.J., Larsson, C., Lui, W.O., Hoog, A. und Von Euler, H., 2006, A dog pedigree with familial medullary thyroid cancer. *Int J Oncol* 29, 1173-1182.
- Lee, J.Y., Uzuka, Y., Tanabe, S. und Sarashina, T., 2004, Prevalence of thyroglobulin autoantibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay of canine serum in hypothyroid, obese and healthy dogs in Japan. *Res Vet Sci* 76, 129-132.
- Li, Y., Shen, R.F., Tsai, S.Y. und Woo, S.L., 1988, Multiple hepatic trans-acting factors are required for in vitro transcription of the human alpha-1-antitrypsin gene. *Mol Cell Biol* 8, 4362-4369.
- Licht, P., 1994, Thyroxine-binding protein represents the major vitamin D-binding protein in the plasma of the turtle, *Trachemys scripta*. *Gen Comp Endocrinol* 93, 82-92.
- Licht, P., Denver, R.J. und Herrera, B.E., 1991, Comparative survey of blood thyroxine binding proteins in turtles. *J Exp Zool* 259, 43-52.
- Liebich, H.-G., 1993, Endokrines System (Systema endocrina), In: Liebich, H.-G. (Ed.) *Funktionelle Histologie*. Schattauer Verlag, Stuttgart, pp. 135-151.
- Lim, C.F., Curtis, A.J., Barlow, J.W., Topliss, D.J. und Stockigt, J.R., 1991, Interactions between oleic acid and drug competitors influence specific binding of thyroxine in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 73, 1106-1110.
- Liu, Y., Xia, X., Fondell, J.D. und Yen, P.M., 2006, Thyroid hormone-regulated target genes have distinct patterns of coactivator recruitment and histone acetylation. *Mol Endocrinol* 20, 483-490.
- Loar, A.S., 1986, Canine thyroid tumors, In: Kirk, R.W. (Ed.) *Current Veterinary Therapy IX Small Animal Practice*. WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 1033-1039.
- Mannavola, D., Vannucchi, G., Fugazzola, L., Cirello, V., Campi, I., Radetti, G., Persani, L., Refetoff, S. und Beck-Peccoz, P., 2006, TGB Deficiency: description of two novel mutations associated with complete TBG deficiency and review of the literature. *J Mol Med* 84, 864-871.
- Mansfield, C.S. und Mooney, C.T., 2006, Lymphocytic-plasmacytic thyroiditis and glomerulonephritis in a boxer. *J Small Anim Pract* 47, 396-399.
- Martin, L.J., Siliart, B., Dumon, H.J. und Nguyen, P.G., 2006, Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 90, 355-360.
- Matthews, J.C., Hori, K. und Cormier, M.J., 1977, Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochemistry* 16, 85-91.
- McCutchan, J.H. und Pagano, J.S., 1968, Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *J Natl Cancer Inst* 41, 351-357.
- Meissner, M., 1924, Die Schilddrüse beim Zwerghund. *Z Anat* 70, 598-600.

- Mendel, C.M., 1989, The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 10, 232-274.
- Mendel, C.M., Cavalieri, R.R., Gavin, L.A., Pettersson, T. und Inoue, M., 1989, Thyroxine transport and distribution in Nagase albuminemic rats. *J Clin Invest* 83, 143-148.
- Mendel, C.M., Weisiger, R.A., Jones, A.L. und Cavalieri, R.R., 1987, Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study. *Endocrinology* 120, 1742-1749.
- Mengeling, B.J., Pan, F. und Privalsky, M.L., 2005, Novel mode of deoxyribonucleic acid recognition by thyroid hormone receptors: thyroid hormone receptor beta-isoforms can bind as trimers to natural response elements comprised of reiterated half-sites. *Mol Endocrinol* 19, 35-51.
- Meyer, H., 1990, Mineralstoffe: Spurenelemente, In: Meyer, H. (Ed.) *Ernährung des Hundes*. Ulmer Verlag, Stuttgart, pp. 100-108.
- Milinkovitch, M.C., Orti, G. und Meyer, A., 1993, Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature* 361, 346-348.
- Moeller, L.C., Fingerhut, A., Lahner, H., Grasberger, H., Weimer, B., Happ, J., Mann, K. und Janssen, O.E., 2006, C-Terminal Amino Acid Alteration rather than Late Termination Causes Complete Deficiency of Thyroxine-Binding Globulin CD-NeuIsenburg. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Mooney, C.T., 2005, Hyperthyroidism, In: Ettinger, S.J. und Feldman, E.C. (Eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Elsevier Saunders, St. Louis, pp. 1544-1560.
- Mori, Y., Miura, Y., Oiso, Y., Hisao, S. und Takazumi, K., 1995, Precise localization of the human thyroxine-binding globulin gene to chromosome Xq22.2 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 96, 481-482.
- Mori, Y., Refetoff, S., Flink, I.L., Charbonneau, M., Murata, Y., Seo, H., Morkin, E. und Dussault, J.H., 1988, Detection of the thyroxine-binding globulin (TBG) gene in six unrelated families with complete TBG deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 67, 727-733.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A., 1987, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Munro, S.L., Lim, C.F., Hall, J.G., Barlow, J.W., Craik, D.J., Topliss, D.J. und Stockigt, J.R., 1989, Drug competition for thyroxine binding to transthyretin (prealbumin): comparison with effects on thyroxine-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 68, 1141-1147.
- Murata, Y., Magner, J.A. und Refetoff, S., 1986a, The role of glycosylation in the molecular conformation and secretion of thyroxine-binding globulin. *Endocrinology* 118, 1614-1621.
- Murata, Y., Refetoff, S., Sarne, D.H., Dick, M. und Watson, F., 1985, Variant thyroxine-binding globulin in serum of Australian aborigines: its physical, chemical and biological properties. *J Endocrinol Invest* 8, 225-232.
- Murata, Y., Takamatsu, J. und Refetoff, S., 1986b, Inherited abnormality of thyroxine-binding globulin with no demonstrable thyroxine-binding activity and high serum levels of denatured thyroxine-binding globulin. *N Engl J Med* 314, 694-699.
- Neer, T.M. und Reavis, D.U., 1983, Craniopharyngioma and associated central diabetes insipidus and hypothyroidism in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 182, 519-520.
- Nelson, R.W. und Couto, C.G., 2006, *Innere Medizin der Kleintiere*, 1. Auflage Edition. Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, München - Jena.
- Nesbitt, G.H., Izzo, J., Peterson, L. und Wilkins, R.J., 1980, Canine hypothyroidism: a retrospective study of 108 cases. *J Am Vet Med Assoc* 177, 1117-1122.

- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P.H., 1982, Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1, 841-845.
- Nichols, R. und Thompson, L., 1995, Pituitary-Hypothalamic Disease, In: Ettinger, S.J. (Ed.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 1422-1457.
- Nonidez, J., 1931, Innervation of the thyroid gland II. Origin and course of the thyroid nerves in the dog. *Am J Anat* 48, 299-329.
- Ono, M., Hosoe, Y., Azuma, S., Shoji, M., Nara, K., Kondo, N., Shiba, T. und Takamatsu, N., 2001, HNF-1 regulates the liver-specific transcription of the chipmunk HP-20 gene. *Gene* 277, 121-127.
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L. und Strait, K.A., 1994, Thyroid hormone action 1994: the plot thickens. *Eur J Endocrinol* 130, 15-24.
- Palha, J.A., Episkopou, V., Maeda, S., Shimada, K., Gottesman, M.E. und Saraiva, M.J., 1994, Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain. *J Biol Chem* 269, 33135-33139.
- Pancieria, D.L., 1994, Hypothyroidism in dogs: 66 cases (1987-1992). *J Am Vet Med Assoc* 204, 761-767.
- Pancieria, D.L., 1999, Is it possible to diagnose canine hypothyroidism? *J Small Anim Pract* 40, 152-157.
- Pancieria, D.L., 2001, Conditions associated with canine hypothyroidism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 31, 935-950.
- Pancieria, D.L. und Refsal, K.R., 1994, Thyroid function in dogs with spontaneous and induced congestive heart failure. *Can J Vet Res* 58, 157-162.
- Pavgi, S. und Licht, P., 1992, Measurement of plasma thyroxine binding protein in relation to thyroidal condition in the turtle, *Trachemys scripta*, by radioimmunoassay. *Gen Comp Endocrinol* 85, 147-155.
- Pepe, G.J., Jury, H.H., Hammond, G.L. und Albrecht, E.D., 1996, Developmental regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the baboon fetus. *Endocrinology* 137, 3323-3328.
- Peterson, M. und Ferguson, D.C., 1989, Thyroid Diseases, In: Ettinger, S.J. (Ed.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 1632-1675.
- Reese, S., Breyer, U., Deeg, C., Kraft, W. und Kaspers, B., 2005, Thyroid sonography as an effective tool to discriminate between euthyroid sick and hypothyroid dogs. *J Vet Intern Med* 19, 491-498.
- Refetoff, S., 1982, Syndromes of thyroid hormone resistance. *Am J Physiol* 243, E88-98.
- Refetoff, S., 2003, Resistance to thyroid hormone with and without receptor gene mutations. *Ann Endocrinol (Paris)* 64, 23-25.
- Refetoff, S., Larsen, P.R., 1989, Transport, cellular uptake and metabolism of thyroid hormone, In: DeGroot, L.J. (Ed.) *Endocrinology*. WB Saunders, Philadelphia, pp. 541-561.
- Refetoff, S., Murata, Y., Mori, Y., Janssen, O.E., Takeda, K. und Hayashi, Y., 1996, Thyroxine-binding globulin: organization of the gene and variants. *Horm Res* 45, 128-138.
- Refetoff, S., Robin, N.I. und Fang, V.S., 1970, Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrate species: a study of PBI, serum T4, free T4, and the pattern of T4 and T3 binding to serum proteins. *Endocrinology* 86, 793-805.
- Reimers, T.J., McCann, J.P., Cowan, R.G. und Concannon, P.W., 1982, Effects of storage, hemolysis, and freezing and thawing on concentrations of thyroxine, cortisol, and insulin in blood samples. *Proc Soc Exp Biol Med* 170, 509-516.

- Rentoumis, A., Chatterjee, V.K., Madison, L.D., Datta, S., Gallagher, G.D., Degroot, L.J. und Jameson, J.L., 1990, Negative and positive transcriptional regulation by thyroid hormone receptor isoforms. *Mol Endocrinol* 4, 1522-1531.
- Reutrakul, S., Dumitrescu, A., Macchia, P.E., Moll, G.W., Jr., Vierhapper, H. und Refetoff, S., 2002, Complete thyroxine-binding globulin (TBG) deficiency in two families without mutations in coding or promoter regions of the TBG genes: in vitro demonstration of exon skipping. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1045-1051.
- Richardson, S.J., Bradley, A.J., Duan, W., Wettenhall, R.E., Harms, P.J., Babon, J.J., Southwell, B.R., Nicol, S., Donnellan, S.C. und Schreiber, G., 1994, Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins. *Am J Physiol* 266, R1359-1370.
- Richardson, S.J., Monk, J.A., Shepherdley, C.A., Ebbesson, L.O., Sin, F., Power, D.M., Frappell, P.B., Kohrle, J. und Renfree, M.B., 2005, Developmentally regulated thyroid hormone distributor proteins in marsupials, a reptile, and fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1264-1272.
- Rienhoff, W., 1938, The lymphatic vessels of the thyroid gland in the dog and in man. *Arch Surg* 23, 783-804.
- Robbins, J., 2005, Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding, In: Braverman, L.E., Utiger, R.D. (Ed.) *Werner and Ingbar's The thyroid: a fundamental and clinical text*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 97-108.
- Robbins, J. und Rall, J.E., 1957, The interaction of thyroid hormones and protein in biological fluids. *Recent Prog Horm Res* 13, 161-202; discussion 202-168.
- Roediger, W.E., 1973, A comparative study of the normal human neonatal and the canine thyroid C cell. *J Anat* 115, 255-276.
- Rosychuk, R.A., 1982, Thyroid hormones and antithyroid drugs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 12, 111-148.
- Ruschig, S., 1997, Endogenes TSH in der Diagnostik der caninen Hypothyreose.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R., 1992, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24, 104-108.
- Savu, L., Vranckx, R., Rouaze-Romet, M., Maya, M., Nunez, E.A., Treton, J. und Flink, I.L., 1991, A senescence up-regulated protein: the rat thyroxine-binding globulin (TBG). *Biochim Biophys Acta* 1097, 19-22.
- Schaer, M., 2003, Disorders of the Thyroid Gland, In: Schaer, M. (Ed.) *Clinical Medicine of the Dog and Cat*. Manson Publishing/The Veterinary Press, pp. 372-379.
- Schreiber, G. und Richardson, S.J., 1997, The evolution of gene expression, structure and function of transthyretin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 116, 137-160.
- Scott-Moncrieff, J.C.R. und Guptill-Yoran, L., 2005, Hypothyroidism, In: Ettinger, S.J. und Feldman, E.C. (Eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Elsevier Saunders, St. Louis, pp. 1535-1544.
- Seo, H., Ando, M., Yamauchi, K., Matsui, N. und Takenaka, O., 1989, Plasma thyroxine-binding proteins and thyroid hormone levels in primate species; is callithricidae thyroid hormone resistant? *Endocrinol Jpn* 36, 665-673.
- Seralini, G.E., 1996, Regulation factors of corticosteroid-binding globulin: lesson from ontogenesis. *Horm Res* 45, 192-196.
- Shahrara, S., Tidholm, A., Drvota, V., Haggstom, J. und Sylven, C., 1999, Upregulation of thyroid hormone receptor beta 1 and beta 2 messenger RNA in the myocardium of dogs with dilated cardiomyopathy or chronic valvular disease. *Am J Vet Res* 60, 848-852.

- Skjoldebrand, L., Brundin, J., Carlstrom, A. und Pettersson, T., 1986, Thyroxine-binding globulin in spontaneous abortion. *Gynecol Obstet Invest* 21, 187-192.
- Skubella, N., 2005. Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung des equinen Thyroxin-bindenden Globulins. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Slebodzinski, A., 1994, Schilddrüse, In: Döcke, F. (Ed.) *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 228-292.
- Smith, C.L. und Hammond, G.L., 1992, Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat. *Endocrinology* 130, 2245-2251.
- Snyder, S.M., Cavalieri, R.R., Goldfine, I.D., Ingbar, S.H. und Jorgensen, E.C., 1976, Binding of thyroid hormones and their analogues to thyroxine-binding globulin in human serum. *J Biol Chem* 251, 6489-6494.
- Spek, C.A., Lannoy, V.J., Lemaigre, F.P., Rousseau, G.G., Bertina, R.M. und Reitsma, P.H., 1998, Type I protein C deficiency caused by disruption of a hepatocyte nuclear factor (HNF)-6/HNF-1 binding site in the human protein C gene promoter. *J Biol Chem* 273, 10168-10173.
- Stephan, I., Nolte, I. und Hoppen, H.O., 2003, [The effect of hypothyroidism on cardiac function in dogs]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 110, 231-239.
- Sterling, K., 1979a, Thyroid hormone action at the cell level (first of two parts). *N Engl J Med* 300, 117-123.
- Sterling, K., 1979b, Thyroid hormone action at the cell level (second of two parts). *N Engl J Med* 300, 173-177.
- Stockhaus, C., Kooistra, H., 2003, Zur Hypothyreose des Hundes. *Veterinärspiegel* 1, 23-24.
- Thompson, E.J., Stirtzinger, T., Lumsden, J.H. und Little, P.B., 1980, Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of canine thyroid carcinoma. *Can Vet J* 21, 186-188.
- Trent, J.M., Flink, I.L., Morkin, E., van Tuinen, P. und Ledbetter, D.H., 1987, Localization of the human thyroxine-binding globulin gene to the long arm of the X chromosome (Xq21-22). *Am J Hum Genet* 41, 428-435.
- Tsykin, A. und Schreiber, G., 1993, Sheep thyroxine-binding globulin: cDNA sequence and expression. *Mol Cell Endocrinol* 98, 91-97.
- van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K. und Kalsheker, N., 2003, Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1536-1547.
- Voigt, K., 1994, Endokrines System, In: Klinke, R., Silbernagel, S. (Ed.) *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York.
- Vranckx, R., Rouaze-Romet, M., Savu, L., Mechighel, P., Maya, M. und Nunez, E.A., 1994, Regulation of rat thyroxine-binding globulin and transthyretin: studies in thyroidectomized and hypophysectomized rats given tri-iodothyronine or/and growth hormone. *J Endocrinol* 142, 77-84.
- Vranckx, R., Rouaze, M., Savu, L., Nunez, E.A., Beaumont, C. und Flink, I.L., 1990a, The hepatic biosynthesis of rat thyroxine binding globulin (TBG): demonstration, ontogenesis, and up-regulation in experimental hypothyroidism. *Biochem Biophys Res Commun* 167, 317-322.
- Vranckx, R., Savu, L., Maya, M. und Nunez, E.A., 1990b, Characterization of a major development-regulated serum thyroxine-binding globulin in the euthyroid mouse. *Biochem J* 271, 373-379.
- Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.D. und Fletterick, R.J., 1995, A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378, 690-697.
- Wang, S., Matthews, S.G., Jeffray, T.M., Stevens, M.Y., Yang, K., Hammond, G.L. und Challis, J.R., 1997, The effects of estradiol-17 beta infusion into fetal sheep in late gestation. *Endocrine* 6, 271-278.

- Wartofsky, L. und Burman, K.D., 1982, Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the "euthyroid sick syndrome". *Endocr Rev* 3, 164-217.
- Wenzel, K.W., 1981, Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function. *Metabolism* 30, 717-732.
- Xu, B. und Koenig, R.J., 2005, Regulation of thyroid hormone receptor alpha2 RNA binding and subcellular localization by phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol* 245, 147-157.
- Zhao, X.F., Underhill, D.A. und Hammond, G.L., 1997, Hepatic nuclear proteins that bind cis-regulatory elements in the proximal promoter of the rat corticosteroid-binding globulin gene. *Mol Cell Endocrinol* 126, 203-212.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, sehr herzlich bedanken.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Onno E. Janßen für die Überlassung des Themas sowie für seine Diskussionsbereitschaft und sein Verständnis. Die hervorragende Betreuung hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. R. Gerstberger für die freundliche Übernahme und Vertretung dieser Dissertation in der Veterinärmedizin.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Lars Möller für die Betreuung während der Laborarbeit, für die Geduld und die kritische Durchsicht der Dissertation.

Danken möchte ich auch Frau Andrea Jäger für die freundliche Hilfe beim Erlernen der Methoden.

Für die Unterstützung in allen Computerfragen und der Anleitung beim Design der Grafiken danke ich Herrn Yura Heger ganz herzlich.

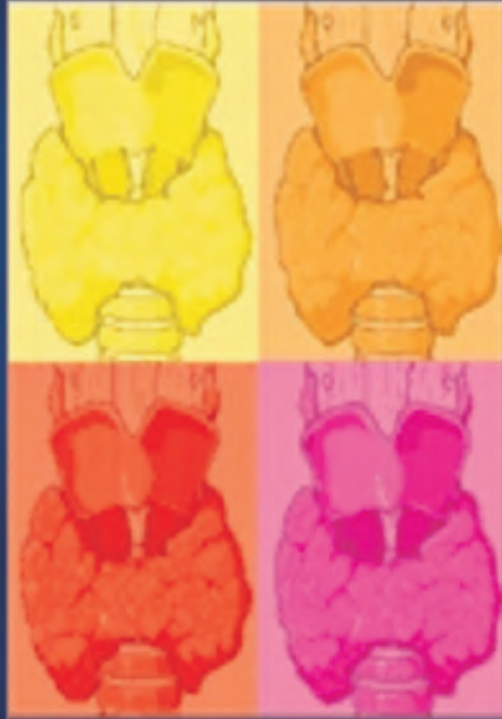
Meiner Mutter Renate Kniezner und meinem Schwiegervater Dr. Onno Janßen und meinen Freundinnen, besonders Nicole, Ute, Margret, Angelika, Simone, Susanne und Marion danke ich für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen.

Auszüge der Doktorarbeit wurden vorab als Vortrag und Abstrakt im Rahmen der InnLab-Tagung 2007 in München publiziert.

S. Janssen, L.C. Moeller, A. Jaeger, A.M. Dumitrescu, S. Refetoff, K. Mann, O.E. Janssen

A three nucleotide difference in the HNF-1 binding site of the Thyroxine-binding globulin (TBG) promoter causes low TBG expression in the dog

In: Tierärztliche Praxis 2007; 35 (K): A10



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5148-3



9 7 8 3 8 3 5 9 5 1 4 8 8

